



Tesis doctoral

**ESTUDIO DE CONCORDANCIA ENTRE
EL 8-GENE SCORE Y OTROS TEST MOLECULARES
COMERCIALES (MAMMAPRINT®, ONCOTYPE DX®)
PARA DECIDIR LA NECESIDAD DE QUIMIOTERAPIA
ADYUVANTE EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA
POSITIVO PARA RECEPTORES HORMONALES**

*Memoria presentada para la obtención
del grado de Doctor en Medicina por*
Noelia Martínez Jáñez

Dirigida por el **Prof. Alfredo Carrato Mena**
y el **Dr. Enrique Espinosa Arranz**

Madrid, 2017



Tesis doctoral

**ESTUDIO DE CONCORDANCIA ENTRE EL 8-GENE
SCORE Y OTROS TEST MOLECULARES COMERCIALES
(MAMMAPRINT®, ONCOTYPE DX®) PARA DECIDIR
LA NECESIDAD DE QUIMIOTERAPIA ADYUVANTE
EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA POSITIVO
PARA RECEPTORES HORMONALES**

*Memoria presentada para la obtención
del grado de Doctor en Medicina por*
Noelia Martínez Jáñez

Dirigida por el **Prof. Alfredo Carrato Mena**
y el **Dr. Enrique Espinosa Arranz**

Madrid, 2017

*A Santi y Alejandro PM, por enseñarme la capacidad de querer
ilimitadamente. Sois el motor de mi vida.*

*A Santi PP, por ser mi compañero de viaje, por el tiempo que te he
robado con mis ratos de estudio, por tu sonrisa, tus bromas,
tu comprensión, tu amor, tu ayuda y tu paciencia, porque sin ti, esta
tesis, ni muchas otras cosas, habrían sido posibles.*

*“Eludir el camino que todos conocemos. Seguir hacia adelante
ruta de los que intentan lo que nunca pensaron y se sienten felices
porque hay algo distinto, porque se desvanece de pronto
lo que sobra y no existe el vacío si queremos colmarlo”*

Ernestina de Champourcín

**Memoria presentada para la obtención
del grado de Doctor en Medicina por
Noelia Martínez Jáñez**

Dirigida por el Prof. Alfredo Carrato Mena y el Dr. Enrique Espinosa Arranz

Madrid, 2017

Prof. Alfredo Carrato Mena, catedrático de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares y jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital Ramón y Cajal, y Dr. Enrique Espinosa Arranz, médico jefe de Sección del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz y clínico colaborador docente de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

Certifican:

Que Dña. Noelia Martínez Jáñez ha realizado durante los últimos dos años, bajo nuestra dirección, el trabajo titulado “**Estudio comparativo entre el 8-gene Score y otros test moleculares comerciales (MammaPrint®, Oncotype DX®) para decidir la necesidad de quimioterapia adyuvante en pacientes con cáncer de mama positivo para receptores hormonales**”, para optar al grado de Doctor en Medicina.

Estimamos que su trabajo es novedoso y original, además de reunir los requisitos necesarios de interés científico y rigor metodológico para ser aceptado para su presentación.

Madrid,

Prof. Alfredo Carrato Mena

Dr. Enrique Espinosa Arranz

Tesis doctoral

ÍNDICE

ABREVIATURAS	14
ÍNDICE DE TABLAS	15
ÍNDICE DE FIGURAS	16
INTRODUCCIÓN	21
1. Generalidades del cáncer de mama	21
1.1 Epidemiología y factores de riesgo	21
1.2 Subtipos histológicos y moleculares	23
1.3 Diagnóstico y estadificación de la enfermedad	25
1.4 Generalidades del tratamiento del cáncer de mama localizado	26
2. Principales factores pronósticos y predictivos de respuesta	28
3. Medición de la expresión génica: RT-qPCR y matrices (microarrays) de ADN y RT-qPCR	30
4. Subtipos moleculares de cáncer de mama	35
5. Plataformas moleculares del cáncer de mama	36
5.1 MammaPrint®	36
5.2 Oncotype DX®	37
5.3 EndoPredict®	38
5.4 Prosigna® (PAM50)	39
5.5 8-gene Score	40
6. Diferentes valores pronósticos de las plataformas génicas	41
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
1. Hipótesis	47
2. Objetivos	48
MATERIAL Y MÉTODOS	53
1. Pacientes y datos clínicos	53
2. Procesamiento de las muestras	56
3. Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc	56

4. Estudio de expresión génica mediante RT-qPCR.....	57
5. Medición de la expresión génica de 8-gene Score	57
6. Medición de la expresión génica de Oncotype DX®	58
7. Medición de la expresión génica de MammaPrint®	59
8. Estadística	60

RESULTADOS.....65

1. Análisis descriptivo de la muestra del estudio.....	65
2. Análisis descriptivo de la plataforma MammaPrint®	67
3. Análisis descriptivo de la plataforma Oncotype®	69
4. Análisis de la concordancia de 8-gene Score con MammaPrint®	71
5. Análisis de la concordancia de 8-gene Score con Oncotype DX®	72
6. Análisis de la concordancia de los datos pronósticos clínico-patológicos clásicos (T2, N1mic, RP, grado III, ILV y Ki67% > 20%)y los perfiles génicos: Oncotype DX®, MammaPrint® y 8-gene Score	73
7. Correlación de la expresión de RE, PR y HER2 mediante IHQ y expresión génica de MammaPrint® y Oncotype DX®	75
7.1 Correlación de la expresión de RE, PR y HER2 mediante IHQ y expresión génica de MammaPrint®	75
7.2 Correlación de la expresión de RE, PR y HER2 mediante IHQ y expresión génica de Oncotype DX®	76
8. Porcentaje del cambio de la decisión de la actitud terapéutica entre los factores clínico-patológicos clásicos y MammaPrint® y Oncotype DX®	77
8.1 Análisis global	77
8.2 Análisis del grupo de pacientes a las que se solicitó Oncotype Dx®	79
8.2.1 Análisis del grupo de pacientes Oncotype Dx® de bajo riesgo	80
8.2.2 Análisis del grupo de pacientes Oncotype Dx® de alto riesgo	81
8.2.3 Análisis del grupo de pacientes Oncotype Dx® global	82
8.3 Análisis del grupo de pacientes a las que se solicitó MammaPrint®	84
8.3.1 Análisis del grupo de pacientes MammaPrint® de bajo riesgo	85
8.3.2 Análisis del grupo de pacientes MammaPrint® de alto riesgo	86
8.3.3 Análisis del grupo de pacientes MammaPrint® global	87

9. Porcentaje del cambio de la decisión de la actitud terapéutica con 8-gene Score respecto al resto de plataformas.....	88
DISCUSIÓN.....	93
1. Análisis de concordancia.....	94
1.1 Población de estudio.....	94
1.2 Diferencias entre los test genómicos Oncotype DX®, MammaPrint® y 8-gene Score: tipo y número de genes de estudio y técnica utilizada	95
1.3 Revisión de validación de los diferentes test génicos.....	97
1.3.1 Oncotype DX®.....	97
1.3.2 MammaPrint®	99
1.3.3 8-gene Score.....	100
1.4 Falta de concordancia en nuestro trabajo y otros estudios de concordancia con MammaPrint® y Oncotype DX®.....	101
2. Asociación de los parámetros clínico-patológicos clásicos (T2, N1mic, grado III, ILV, RP y Ki67% > 20%) y los perfiles génicos con la probabilidad de cambio de tratamiento tras el test genómico.....	103
3. Correlación de la expresión de RE, RP y HER2 mediante IHQ y expresión génica de Oncotype DX® y MammaPrint®	104
4. Cambio de la decisión terapéutica entre los factores clínico-patológicos clásicos y Oncotype DX® o MammaPrint®	104
5. Cambio de la decisión de la actitud terapéutica con 8-gene Score en los Hospitales Universitarios Ramón y Cajal, La Paz y Basurto.....	105
6. Limitaciones de este estudio	106
CONCLUSIONES.....	107
RESUMEN.....	111
AGRADECIMIENTOS	115
BIBLIOGRAFÍA	121

ABREVIATURAS

ABCSG: *Austrian Breast & Colorectal Cancer Study Group*

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

AJCC: American Joint Committee on Cancer

ARN/RNA: ácido ribonucleico

ARNm/RNAM: ácido ribonucleico mensajero

ATAC: *Arimidex, tamoxifen alone or in combination*

BRCA1: *Breast Cancer Type 1 susceptibility protein*

BRCA2: *Breast Cancer Type 2 susceptibility protein*

CLIA: *clinical laboratory improvement amendments*

CM: cáncer de mama

Cq: ciclo de cuantificación, del inglés *Quantification cycle*. Es la nomenclatura propuesta según las recomendaciones MIQE de 2009

Ct: equivale al Cq anterior, según la nomenclatura de Applied Biosystems, del inglés *Threshold cycle*

EC: esquema de quimioterapia que contiene epirrubicina y ciclofosfamida

EP: EndoPredict®

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (en inglés, *Polymerase Chain Reaction*)

FFPE: *Formalin-fixed, paraffin embedded*

FISH: inmunofluorescencia de hibridación *in situ*

FN: factor de normalización

G: grado nuclear

GEICAM: Grupo Español de Investigación de Cáncer de Mama

HBAS: Hospital de Basurto

HER2: receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano

HRyC: Hospital Ramón y Cajal

HULP: Hospital Universitario La Paz

HT: hormonoterapia

IHQ: inmunohistoquímica

IR: índice de recaída

ILV: invasión linfovascular

MINDACT: *Microarray in Node-Negative Disease May Avoid Chemotherapy*

MIQE: *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*

N: afectación ganglionar

NKI: Instituto Nacional del Cáncer Holandés

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

QHT: tratamiento combinado de quimioterapia y hormonoterapia

QT: quimioterapia

RE: receptor de estrógenos

RH: receptores hormonales

RP: receptor de progesterona

RS: *recurrence score* (Oncotype DX®)

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real

TAILORx: *Trial Assigning Individualized Options for Treatment*

TRANSBIG: proyecto de acercamiento del trabajo de laboratorio a los tratamientos mediante la investigación translacional

TNM: es el sistema de estadificación del cáncer de mayor uso, basado en el tamaño tumoral (T), afectación ganglionar (N) y afectación metastásica (M)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores de riesgo de desarrollar cáncer de mama

Tabla 2. Subtipos moleculares de cáncer de mama

Tabla 3. Sistema de estadificación de los carcinomas de mama (American Joint Committee on Cancer TNM Staging System, 2002)

Tabla 4. Estadios según la clasificación TNM

Tabla 5. Principales toxicidades del tratamiento adyuvante en el cáncer de mama

Tabla 6. Criterios de inclusión y exclusión de pacientes de estudio

Tabla 7. Descriptiva de los pacientes

Tabla 8. Resultados del Oncotype DX® estratificados en RS < o > 25

Tabla 9. Resultados del Oncotype DX® estratificados en RS bajo: ≤ 18 ; intermedio: 19-30; alto: ≥ 31

Tabla 10. Descriptiva según clasificación del riesgo de MammaPrint®

Tabla 11. Descriptiva según clasificación del riesgo de Oncotype DX®

Tabla 12. Concordancia entre MammaPrint® y 8-gene Score

Tabla 13. Valoración del *índice kappa* (criterio de Landis y Koch)

Tabla 14. Concordancia entre Oncotype DX® (dicotomizado en 25) y 8-gene Score

Tabla 15. Concordancia entre Oncotype DX® y 8-gene Score

Tabla 16. Análisis univariante de la asociación de factores pronóstico con el riesgo según los test de clasificación

Tabla 17. Concordancia RP resultados anatomo-clínicos vs. MammaPrint®

Tabla 18. Concordancia HER2 resultados anatomo-clínicos vs. MammaPrint®

Tabla 19. Concordancia RP resultados anatomo-clínicos vs. Oncotype DX®

Tabla 20. Decisión terapéutica previa a la realización del test

Tabla 21. Cambio de decisión global según terapia prevista

Tabla 22. Cambio de decisión según terapia prevista y test Oncotype DX®

Tabla 23. Cambio de decisión según terapia prevista y test Oncotype DX® < 25

Tabla 24. Cambio de decisión según terapia prevista y test Oncotype DX® > 25

Tabla 25. Recomendación de tratamiento final tras Oncotype DX® > 25

Tabla 26. Recomendación de QT final tras Oncotype DX® < 25

Tabla 27. Cambio de decisión según terapia prevista y test MammaPrint®

Tabla 28. Cambio de decisión según terapia prevista y test MammaPrint® de bajo riesgo

Tabla 29. Cambio de decisión según terapia prevista y test MammaPrint® de alto riesgo

Tabla 30. Cambio de decisión según terapia prevista y test 8-gene Score

Tabla 31. Tabla de recurrencia a distancia según RS en estudio de validación Oncotype DX®

Tabla 32. Tabla de recurrencia a distancia según RS en estudio de validación MammaPrint®

Tabla 33. Diferencias de resultados de buen y mal pronóstico de MammaPrint® entre el estudio de validación y nuestra serie

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Casos extremos de pacientes con carcinoma de mama localizado.

Figura 2. Tecnologías que permiten medir la expresión génica.

Figura 3. *Microarray* de ADN para el estudio génico (adaptado de <http://ADN-ARN.net/2011/07/08/ADN-microarrays/>)

Figura 4. Técnica de PCR.

Figura 5. Técnica de RT-qPCR: emisión de fluorescencia.

Figura 6. Técnica de RT-qPCR: relación entre cantidad de ADN y Ct.

Figura 7. Cálculo del IR. A los valores de expresión de los diferentes genes se les asigna un valor matemático y la suma de estos constituye el índice de recurrencia.

Figura 8. Número de pacientes y plataformas génicas realizados en los dos hospitales de estudio.

Figura 9. Gráfica representativa de la opción de tratamiento recibido en función del resultado de MammaPrint®.

Figura 10. Gráfica representativa de la opción de tratamiento recibido en función del resultado de Oncotype DX®.

Figura 11. Decisión global terapéutica previa a la realización del test.

Figura 12. Decisión global de tratamiento previsto y decisión final tras perfil génico.

Figura 13. Cambio de decisión global según terapia prevista.

Figura 14. Decisión de tratamiento previsto y decisión final tras Oncotype DX®.

Figura 15. Cambio de decisión según terapia prevista con Oncotype DX®.

Figura 16. Decisión de tratamiento previsto y decisión final tras Oncotype DX® < 25.

Figura 17. Decisión de tratamiento previsto y decisión final tras Oncotype DX® > 25.

Figura 18. Decisión inicial en las pacientes a las que se realizó Oncotype DX®.

Figura 19. Tratamientos pautados definitivamente, en función de resultados de Oncotype DX® y variables clínicas.

Figura 20. Decisión de tratamiento previsto y decisión final tras MammaPrint®.

Figura 21. Cambio de decisión según terapia prevista con MammaPrint®.

Figura 22. Cambio de decisión en MammaPrint® de bajo riesgo.

Figura 23. Cambio de decisión en MammaPrint® de alto riesgo.

Figura 24. Decisión inicial y final en MammaPrint® desglosada en bajo y alto riesgo.

Figura 25. Decisión de tratamiento previsto y decisión final tras 8-gene Score.

Figura 26. Cambio de decisión según terapia prevista con 8-gene Score.

Figura 27. Genes analizados por el test genómico Oncotype DX® (en azul) y MammaPrint® (en verde). En rojo, el gen SCUBE2 común a ambas plataformas genómicas.

Tesis doctoral

INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES DEL CÁNCER DE MAMA

1.1 Epidemiología y factores de riesgo

El cáncer de mama (CM) supone un gran problema de salud pública. Es el tumor con mayor incidencia en el sexo femenino y constituye el 36% de las muertes por cáncer al año en Estados Unidos¹. El CM también es el tumor más frecuente entre las mujeres españolas, suponiendo casi la cuarta parte de los casos de cáncer femenino. Su incidencia está aumentando entre un 2-3% cada año, en parte debido al diagnóstico precoz de la enfermedad². Desde 1975, la mortalidad en esta patología ha disminuido de manera significativa, sobre todo en las pacientes más jóvenes y en aquellas con receptores hormonales negativos, debido a los avances tanto en el diagnóstico precoz como en la terapia adyuvante³⁻⁵.

El CM se asocia a diversos factores de riesgo, entre los que se encuentran los siguientes (tabla 1):

- a. *Sexo*. La incidencia es cien veces mayor en mujeres que en hombres⁶. Los factores de riesgo para el desarrollo de CM en hombres son el síndrome de Klinefelter y la patología testicular y hepática⁷.
- b. *Edad*. El riesgo aumenta principalmente a partir de los 45-50 años⁸.
- c. *Raza*. A pesar de tratarse de una enfermedad muy prevalente en todas las razas, en las estadísticas americanas predomina en la población de raza blanca⁹.
Parece que esta mayor incidencia en mujeres de raza blanca se debe a diferencias socioeconómicas y del estilo de vida (obesidad, escasa actividad física, ingesta de alcohol, tabaco...).
- d. *Enfermedad mamaria benigna previa*. Los cambios fibroquísticos mamarios, los papilomas solitarios o los fibroadenomas simples no parecen aumentar el riesgo de CM,

pero sí lo hacen las lesiones proliferativas con atipia celular (hiperplasia ductal atípica y carcinoma lobulillar *in situ*), sobre todo cuando la atipia es multifocal^{10,11}.

e. *Historia personal y familiar de cáncer de mama*. En las pacientes con antecedentes de CM *in situ*, el riesgo de desarrollar un tumor contralateral es del 5% a los diez años aproximadamente, siendo este mayor en los casos en los que el tumor ha sido invasivo, sobre todo en las mujeres premenopáusicas¹². También existen síndromes asociados a CM hereditario; sin embargo, solo un 15-20% de los casos tienen antecedentes familiares de esta enfermedad. La causa hereditaria más habitual de CM son las mutaciones germinales en los genes de reparación del ADN, BRCA1 y BRCA2. Otros genes involucrados con menos frecuencia en la transmisión familiar del riesgo de CM son: CHEK2, TP53, PTEN, PALB2 y STK11.

f. *Factores hormonales y reproductivos*. Una exposición prolongada a los estrógenos endógenos (menarquia precoz, menopausia tardía, edad tardía de primer embarazo, infertilidad y ausencia de lactancia mamaria) o exógenos (anticonceptivos orales, terapia hormonal sustitutiva en la menopausia y tratamiento de infertilidad) aumenta de manera significativa el riesgo de padecer CM¹³.

g. *Exposición a la radiación ionizante*. El efecto de la radiación relacionada con las pruebas de imagen, como tomografía o radiografías simples, está aún en entredicho. Sin embargo, la asociación con el tratamiento radioterápico previo, sobre todo en la época adolescente (linfoma de Hodgkin) y con la exposición a radiación nuclear, ha sido claramente demostrada^{14,15}.

Tabla1. Factores de riesgo de desarrollar cáncer de mama

Sexo (mujeres)
Edad (mayor de 45-50 años)
Raza blanca
Obesidad
Tabaco
Escaso ejercicio
Alcohol
Patología mamaria benigna previa
Antecedentes familiares y personales de cáncer de mama (mutaciones en BRCA1 y BRCA2)
Exposición a estrógenos (menarquia precoz, menopausia tardía, edad tardía de primer embarazo, infertilidad y ausencia de lactancia mamaria)
Exposición a radiación ionizante

1.2 Subtipos histológicos y moleculares

Actualmente se considera que el CM no es una entidad única, sino un amplio abanico de tumores heterogéneos y fenotípicamente diferentes. Ya desde el estudio anatómo-patológico clásico de la pieza podemos diferenciar las variedades ductal infiltrante (76%), lobulillar infiltrante (8%), ductal/lobulillar no infiltrante (7%), mucinoso (2,4%), tubular (1,5%), medular (1,2%) o papilar (1%)¹⁶.

Mediante estudios de inmunohistoquímica (IHQ) podemos diferenciar los tumores que expresan receptores de hormonas —estrógenos y progesterona— y los tumores que sobreexpresan HER2. De esta manera, en la práctica clínica diaria se habla de tumores con receptores hormonales positivos, tumores HER2+, y tumores que no expresan ninguno de estos marcadores, es decir, triple negativos.

Por otra parte, las técnicas recientes de análisis masivo de expresión génica han permitido definir varios subgrupos moleculares (fig. 1) (tabla 2)^{17,18}:

- a. *Subtipo luminal*. Es el subtipo más frecuente. Se trata de tumores con características muy similares a las del epitelio luminal normal del tejido mamario, expresando citoqueratinas 8 y 18. Asimismo, expresan genes relacionados con los receptores de estrógeno (RE) y de progesterona (RP). Se subdividen en luminal A y luminal B. El subtipo luminal A supone el 40% de los tumores de mama, con elevada expresión génica de receptores hormonales y débil expresión de HER2 y de genes relacionados con la proliferación. El subtipo luminal B supone el 20% de los tumores de mama, presenta mayor expresión de genes relacionados con HER2 y menor de receptores hormonales y, por lo tanto, se asocia con un peor pronóstico que los tumores del subtipo luminal A.
- b. *Subtipo HER2+*. Constituyen el 10-15% de los cánceres de mama. Se caracterizan por positividad para la expresión de genes relacionados con HER2 y negatividad para la expresión de genes hormonales. Resulta interesante señalar que la expresión de genes relacionados con HER2 no conlleva obligatoriamente la sobreexpresión de HER 2 en el tumor; de hecho, solo en la mitad de los casos del subtipo molecular HER2 existe sobreexpresión de HER2. El pronóstico de estos tumores es peor que el de aquellos que no tienen este perfil de expresión génica.

c. *Subtipo basal*. Suponen el 15-20% de los cánceres de mama. Se caracterizan por un perfil de expresión muy similar al de las células basales del epitelio mamario, con ausencia de expresión de genes hormonales o de HER2 y predominio de genes relacionados con la proliferación. Clínicamente presentan un rápido crecimiento y se asocian a un pronóstico desfavorable. La mayoría de los tumores triple negativos se encuadran en este subtipo, pero hay que tener en cuenta que no siempre coinciden; triple negativo es un concepto basado en IHQ, mientras que el subtipo basal se define por el perfil de expresión génica.

d. *Subtipo pobre en claudina* (“*claudin-low*”). Es el subtipo más recientemente descrito y el más infrecuente¹⁹. Su interés radica en la expresión de los genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima (claudina 3, 4 y 7; E-cadherina) y las células madre (CD44+/CD24-). Suponen un pequeño porcentaje de los tumores triple negativos clínicos. A diferencia de los tumores *basal-like*, se trata de neoplasias de más lento crecimiento, que parecen tener un origen oncogénico diferente al de los demás.

e. *Subtipo normal*. Expresa genes similares a los hallados en el tejido mamario normal, por lo que se piensa que en realidad puede tratarse de un artefacto secundario a la contaminación con células sanas.

Conviene insistir en que los subtipos moleculares del CM no siempre se correlacionan con los subtipos clínicos o anatomo-patológicos. Un tumor puede ser del subtipo HER2 por la expresión génica y, sin embargo, negativo para HER2 por técnicas de IHQ o por FISH. Aunque parezca que ambas clasificaciones debieran coincidir, se dan numerosas excepciones.

Tabla 2. Subtipos moleculares de cáncer de mama¹⁷

Subtipo	Características
Luminal	CK 8y 18. Expresión de RH
Luminal A	40%; RH +++; HER2 débil
Luminal B	20%; RH débil; HER2 +++
HER2	10-15%; RH -; HER2 +++
<i>Basal-like</i>	15-20%; RH-; HER2-; agresividad
<i>Claudin-low</i>	RH-; HER2-; genes de TEM
<i>Normal-like</i>	Similar a tejido mamario normal

1.3 Diagnóstico y estadificación de la enfermedad

El diagnóstico precoz se basa en la realización de mamografías anuales en mujeres mayores de 40-50 años. La utilización de otras pruebas de imagen, como la ecografía, ayuda a diferenciar las lesiones sólidas de las quísticas. La resonancia mamaria puede estar justificada en pacientes con mamas densas o en aquellas con alto riesgo de desarrollar la enfermedad debido a su carga genética²⁰. Tras el diagnóstico de sospecha por imagen, es obligatorio realizar una toma de biopsia y un estudio de extensión con pruebas de imágenes complementarias. Con todos estos datos del tamaño tumoral (T), el estado ganglionar (G) y la existencia o no de afectación a distancia (M), podemos clasificar la enfermedad según el sistema TNM (AJCC-UICC)²¹ (tablas 3 y 4).

Tabla 3. Sistema de estadificación de los carcinomas de mama (American Joint Committee on Cancer TNM Staging System, 2002)²¹

Tumor primario (T) (<i>misma clasificación clínica y anatomo-patológica</i>)
<p>T1: hasta 2 cm</p> <p style="padding-left: 20px;">T1mic: < 0,1 cm</p> <p style="padding-left: 20px;">T1a: > 0,1 a 0,5 cm</p> <p style="padding-left: 20px;">T1b: > 0,5 a 1 cm</p> <p style="padding-left: 20px;">T1c: > 1 a 2 cm</p> <p>T2: > 2 a 5 cm</p> <p>T3: > 5 cm</p> <p>T4: extensión a pared torácica o piel</p> <p style="padding-left: 20px;">T4a: extensión a pared torácica</p> <p style="padding-left: 20px;">T4b: edema (incluyendo "piel de naranja") o ulceración de la piel, o nódulos satélites en la piel de la misma mama</p> <p style="padding-left: 20px;">T4c: ambos (T4a + T4b)</p> <p style="padding-left: 20px;">T4d: carcinoma inflamatorio</p>
Ganglios linfáticos regionales (N) (<i>clasificación anatomo-patológica</i>)
<p>pN0: ausencia de metástasis ganglionares</p> <p>pN1mi: micrometástasis (< 2 mm)</p> <p>pN1: metástasis en 1-3 ganglios axilares, y/o ganglios mamarios internos con metástasis microscópicas</p> <p>pN2: metástasis en 4-9 ganglios axilares, o en ganglios mamarios internos clínicamente aparentes en ausencia de metástasis axilares</p> <p>pN3: metástasis en 10 o más ganglios axilares, o en ganglios infraclaviculares, o en ganglios mamarios internos en presencia de metástasis axilares, o en ganglios supraclaviculares</p>
Afectación metastásica a distancia (M)
<p>M0: no hay evidencia de metástasis a distancia</p> <p>M1: metástasis a distancia</p>

Tabla 4. Estadios según la clasificación TNM²¹

Estadio I	T1N0M0
Estadio IIA	T0-1N1M0 T2N0M0
Estadio IIB	T2N1M0 T3N0M0
Estadio IIIA	T0-2N2M0 T3N1-2M0
Estadio IIIB	T4N0-2M0
Estadio IIIC	T0-4N3M0
Estadio IV	T0-4N0-3M1

1.4 Generalidades del tratamiento del cáncer de mama localizado

Los tumores localizados son aquellos que se encuentran exclusivamente en la glándula mamaria o con afectación como máximo de tres ganglios axilares. Se consideran tumores curables desde el inicio. La actitud terapéutica depende, en gran medida, de la extensión de la enfermedad, aunque también influyen la edad, el estado general y la comorbilidad de la paciente.

El tratamiento de un tumor localizado suele comenzar con la extirpación quirúrgica mediante tumorectomía o mastectomía. La radioterapia complementa la cirugía conservadora de la mama y también está indicada tras una mastectomía si hay factores de riesgo, como los ganglios axilares afectados²². El tratamiento adyuvante puede tener también un componente sistémico —con fármacos— que incluya hormonoterapia (HT), terapia anti-HER2 o quimioterapia (QT).

El esquema de tratamiento puede variar cuando el tumor es grande o de rápido crecimiento: en algunos casos se prefiere administrar primero la QT, denominada entonces neoadyuvante. Tras la QT se practica la cirugía y, con posterioridad, el tratamiento adyuvante.

Cuando el tumor expresa receptores hormonales, existe indicación de HT adyuvante, con independencia de que se administre o no QT adyuvante²³. En las mujeres premenopáusicas se administran cinco años de tratamiento con tamoxifeno, evitando los inhibidores de aromatasa²⁴⁻²⁷. En aquellas que no presentan amenorrea tras la QT, así como en las menores de 40 años, se añade un análogo de hormona liberadora de hormona luteinizante al tamoxifeno^{28,29}. En las mujeres posmenopáusicas, la adyuvancia hormonal se realiza con inhibidores de aromatasa o con una secuencia de inhibidores de aromatasa y tamoxifeno, en cualquier caso

también durante al menos cinco años³⁰⁻³³. En ambos grupos, el tratamiento hormonal se inicia una vez finalizado la terapia adyuvante con radioterapia y con QT.

Cuando existe sobreexpresión de HER2, el tratamiento con trastuzumab (anticuerpo anti-HER2) durante un año, añadido a la QT, mejora los resultados de esta³⁴⁻³⁶.

En cuanto a la QT, los esquemas más empleados en la actualidad incluyen una antraciclina y un taxano^{37,38}, por ejemplo, adriamicina más ciclofosfamida, seguida de paclitaxel o el triplete simultáneo de docetaxel, adriamicina y ciclofosfamida³⁹⁻⁴⁵. La QT produce numerosos efectos secundarios, entre los que destacan: alopecia, estomatitis, náuseas, vómitos, diarrea, mielosupresión, neuropatía, infertilidad y, a largo plazo, riesgo de segundas neoplasias y cardiotoxicidad. El riesgo de esta última se correlaciona con la dosis acumulada de antraciclina y aumenta en presencia de una cardiopatía previa, radioterapia mediastínica o tratamiento simultáneo con fármacos como el trastuzumab (tabla 5).

Tabla 5. Principales toxicidades del tratamiento adyuvante en el cáncer de mama

Antraciclinas	
Toxicidad aguda	Alopecia, fotosensibilidad, estomatitis, náuseas, vómitos, anorexia, diarrea, mielosupresión (nadir 10-14 días), amenorrea, infertilidad y flebitis
Toxicidad a largo plazo	Cardiotoxicidad, leucemia aguda
Taxanos	
Toxicidad aguda	Reacciones de hipersensibilidad infusionales, alopecia, retención de líquidos (edemas), mucositis y mielosupresión
Toxicidad a largo plazo	Neuropatía periférica sensitiva

Por tanto, la toxicidad de los esquemas que contienen antraciclinas y taxanos no es despreciable y puede dar lugar a una importante morbilidad a largo plazo. De ahí que la indicación adecuada de estos tratamientos sea indispensable. En los tumores de peor pronóstico, como los que cursan con afectación ganglionar, el tratamiento con QT sistémica adyuvante está claramente definido, pero hay otros casos en los que la indicación es más dudosa y se necesita una estimación adecuada del riesgo de recaída.

2. PRINCIPALES FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS DE RESPUESTA

El estado de los ganglios axilares es el principal factor pronóstico del CM. En líneas generales, la supervivencia a largo plazo de las pacientes con afectación ganglionar es del 50%, si bien este porcentaje depende del número de ganglios infiltrados⁴⁶. El tamaño del tumor primario es el segundo factor en importancia tras la afectación ganglionar. La relación entre tamaño y pronóstico es lineal: la supervivencia de una paciente con un tumor de menos de 1 cm supera el 90%, pero desciende al 70%, aproximadamente, cuando el tamaño está entre 2 y 5 cm⁴⁷⁻⁴⁹.

Otros factores pronósticos son el grado de diferenciación, el índice proliferativo y la expresión de receptores hormonales y HER2. En general, los tumores que no expresan receptores hormonales o que sobreexpresan HER2 tienen un comportamiento más agresivo, igual que aquellos indiferenciados o los que presentan un alto índice proliferativo⁵⁰⁻⁵⁵.

Con el objetivo de intentar seleccionar mejor a las pacientes candidatas a un tratamiento con QT, hace más de quince años se creó el índice pronóstico de Nottingham, que incluía tres factores pronósticos: estado ganglionar, tamaño del tumor y grado histológico⁵⁶. Este índice ha sido validado^{57,58}, pero no es un método que sea habitualmente empleado en la clínica. Por otro lado, existen conferencias internacionales de consenso en las que expertos en CM discuten las posibilidades terapéuticas en cada situación, para tratar de establecer criterios comunes. Ejemplos de ello son las conferencias organizadas por el National Institutes of Health estadounidense en 2000⁵⁹, y las conferencias bianuales que tienen lugar en St. Gallen, Suiza²⁹. Otra herramienta que incluye varios factores clínicos habituales es el Adjuvant! Online, un programa informático que permite a los oncólogos conocer el beneficio que proporciona la terapia adyuvante sobre cada caso concreto (<http://www.adjuvantonline.com>)^{60,61}. La figura 1 muestra dos casos extremos respecto al pronóstico: si este es desfavorable en virtud del tamaño tumoral o la extensión a ganglios axilares, el beneficio de la QT es evidente. Por el contrario, las pacientes con tumores pequeños, bien diferenciados, receptores hormonales positivos y sin afectación axilar no se benefician de la QT.

El problema surge en los casos que tienen un pronóstico intermedio. Estos son frecuentes y las herramientas mencionadas —que se basan en factores clínicos y patológicos tradicionales— ofrecen poca ayuda a la hora de tomar una decisión respecto a la QT adyuvante. Tras la finalización de la secuenciación del genoma humano y la llegada de tecnologías tan poderosas como las matrices de ADN, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, en inglés *polymerase chain reaction*) en tiempo real y la espectrometría de masas, en combinación con la bioinformática, se ha generado una base excelente para la identificación de nuevos marcadores moleculares en cáncer. Estas nuevas tecnologías permiten establecer patrones de expresión de genes y proteínas que pueden correlacionarse con la morfología del tumor, con su comportamiento clínico o con su respuesta al tratamiento. Estos nuevos marcadores pueden complementar la información clínico-patológica clásica con el fin de obtener una predicción más precisa del comportamiento del tumor que la obtenida por los métodos convencionales.

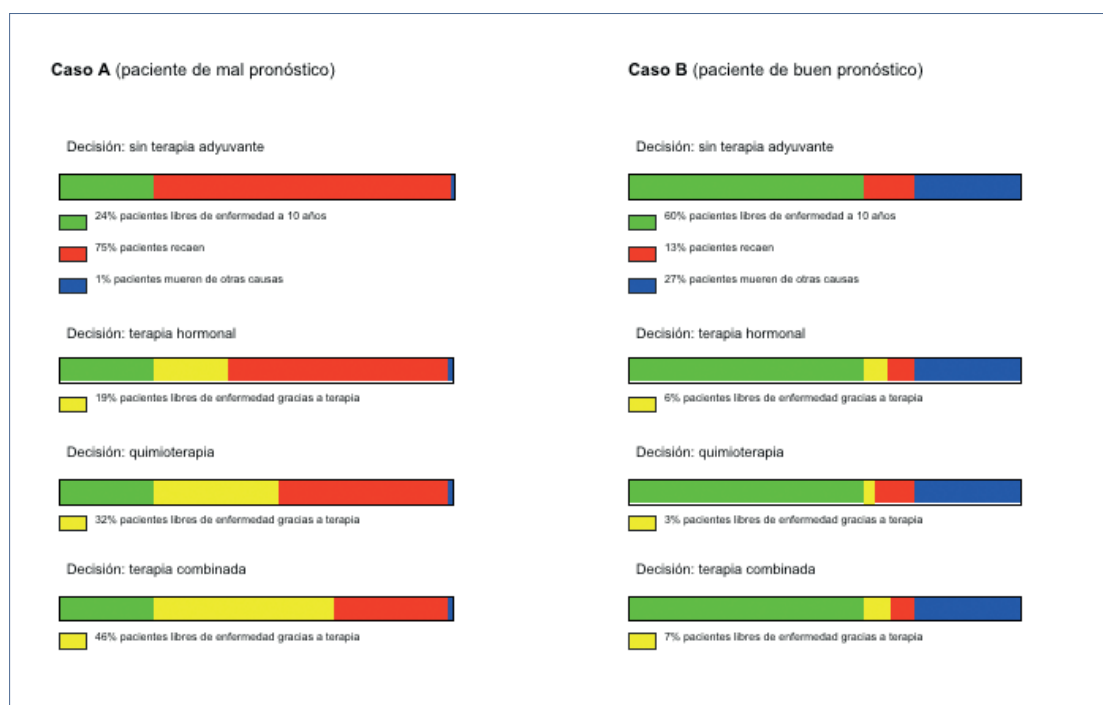


Figura 1. Casos extremos de pacientes con carcinoma de mama localizado. En esta figura se presentan dos casos de riesgo alto (izquierda) y riesgo bajo (derecha) de recaída. **Caso A:** paciente de 45 años, RE+, G3, 1cm < T > 2 cm, 4-9 ganglios afectos y salud general excelente (QT: régimen de tercera generación). **Caso B:** paciente de 75 años, RE+, G1, < 1 cm, N0 (QT: antraciclinas > 4 ciclos > 2 agentes).

Código de color: verde, pacientes que no recaerían en ausencia de terapia adyuvante; rojo, pacientes que recaerían independientemente de la terapia adyuvante recibida; amarillo, porcentaje de pacientes que obtienen beneficio con la terapia adyuvante; azul, mueren de otras causas.

Caso A: sin terapia adyuvante, el 24% de las pacientes están vivas y libres de enfermedad gracias a la cirugía, y el 75%, recaen. El beneficio de la adyuvancia es el siguiente: el 19% están libres de enfermedad a los diez años gracias a la terapia hormonal, el 32%, en el caso de pautar QT, y el 46%, con la terapia combinada. **Caso B:** en ausencia de adyuvancia, el 60% de las pacientes siguen vivas y libres de enfermedad a los diez años, el 13%, recaen, y el 27% mueren de otras causas. El beneficio de la terapia es del 6% en el caso de la terapia hormonal, el 3% con QT y el 7% en terapia combinada.

3. MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA: MATRICES (MICROARRAYS) DE ADN Y RT-QPCR

El campo del análisis de la expresión génica ha evolucionado mucho desde la introducción del *Northern blot* en 1977, que permitió detectar por vez primera moléculas específicas de ARN y medir su expresión⁶². Hoy en día, las técnicas más utilizadas son las matrices de ADN y la PCR en tiempo real.

Las matrices de ADN son una poderosa herramienta para medir los niveles de ácido ribonucleico mensajero que se expresan en un tipo celular en un momento concreto, esto es, para analizar la expresión génica. Esta tecnología sigue los mismos principios que las hibridaciones de un *Southern blot* o un *Northern blot*⁶²⁻⁶⁵, pero a una escala masiva que puede abarcar el genoma completo.

Las matrices son un soporte sólido, generalmente de cristal o de plástico, sobre el que se disponen, de manera ordenada, una serie de sondas específicas, cada una de las cuales representa un gen.

La técnica de matrices está basada en la propiedad física de los ácidos nucleicos para hibridar con secuencias complementarias, a temperaturas y PH adecuados, de manera que las bases complementarias entre una muestra biológica y el ensayo se reconocen y esta hibridación se puede visualizar y cuantificar mediante el uso de un trazador, que generalmente es una molécula fluorescente detectada con un escáner.

Hay diferentes tipos de matrices. Pueden ser genéricas, que cubren la mayor parte del genoma o se pueden diseñar a la carta, incluyendo los genes que interesen para un determinado estudio. Además, las matrices pueden ser de uno o dos colores en función de si se usa una o dos moléculas trazadoras. Estas moléculas competirán por unirse a las sondas de las matrices. Los datos generados se analizan con sofisticados programas informáticos que proporcionan los perfiles de expresión génica de las muestras¹⁸.

No obstante, la técnica de referencia para la cuantificación de la expresión génica es la RT-qPCR, desarrollada a mediados de los noventa⁶⁶ y basada en la PCR previamente desarrollada

por Kary B. Mullis. Gracias a esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN^{67,68}. La figura 2 compara el potencial de ambas técnicas, y la figura 3 explica las matrices de ADN.

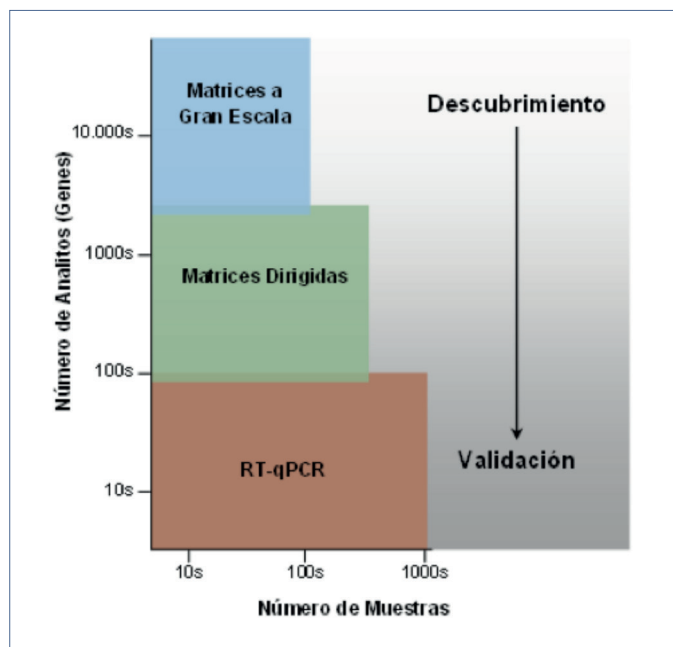


Figura 2. Tecnologías que permiten medir la expresión génica. Los diferentes enfoques tecnológicos para medir expresión génica dependen del número de muestras y genes analizados. A medida que el número de genes disminuye y el número de muestras aumenta, las tecnologías van desde las herramientas de descubrimiento a las de validación e implementación. Para llevar a cabo un experimento que analice un número discreto de genes en un número de hasta varios miles de muestras, la elección es la RT-qPCR. Las matrices de ADN son el método preferido para llevar a cabo experimentos de descubrimiento a gran escala (por ejemplo, a genoma completo). Debido a la logística, la sensibilidad y los costes asociados con las matrices de ADN de genoma completo, también hay un nicho para las matrices dirigidas que permiten el análisis de un menor número de genes en un mayor número de muestras. No obstante, para la validación de descubrimientos con matrices de ADN, el método patrón es la RT-qPCR⁶⁹.

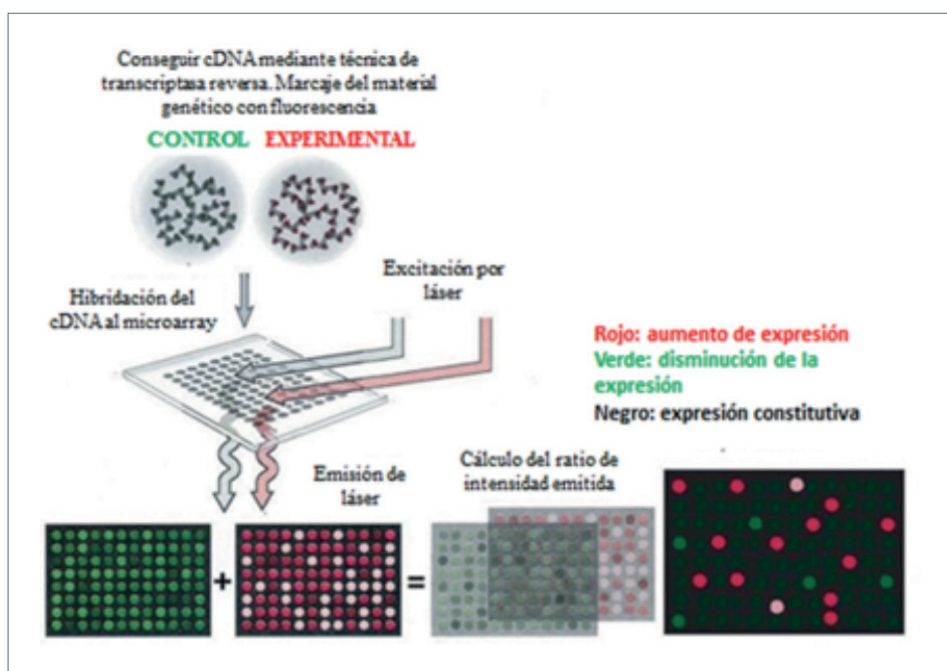


Figura 3. Microarray de ADN para el estudio génico (adaptado de <http://ADN-ARN.net/2011/07/08/ADN-microarrays/>).

La PCR requiere dos oligonucleótidos sintéticos y complementarios de unos 15-20 nucleótidos en las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar. Estos oligonucleótidos actúan como cebadores (*primers*) en la síntesis de ADN que cataliza la enzima Taq polimerasa. La reacción se lleva a cabo en una serie de ciclos (entre 30 y 45 veces) que incrementan exponencialmente el número de hebras de ADN (fig. 4).

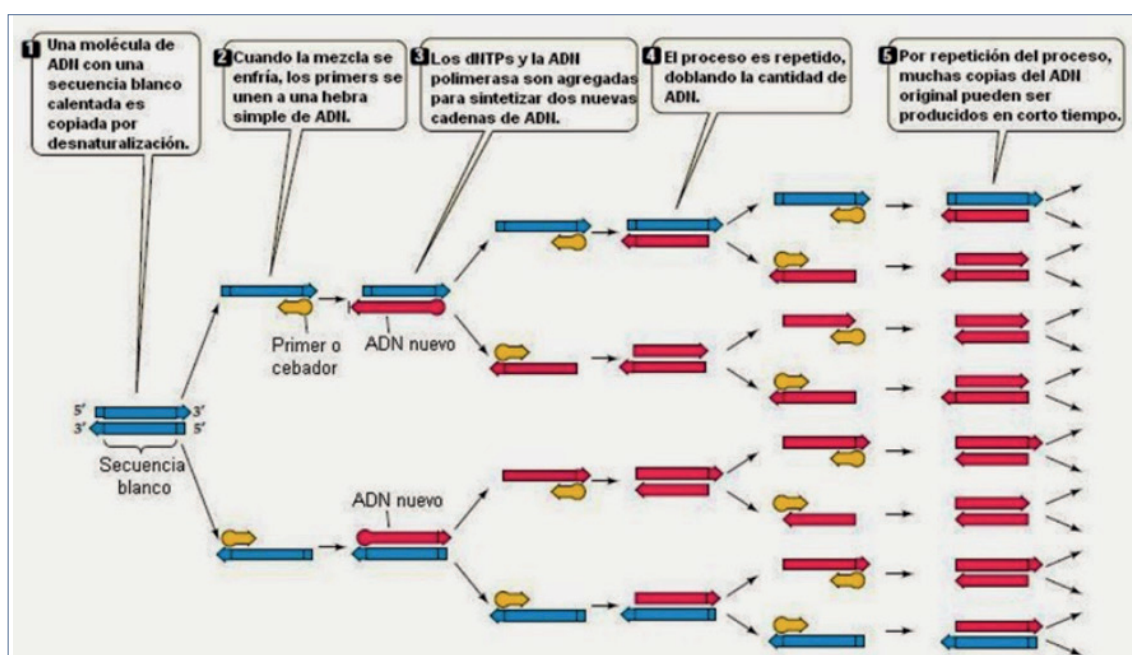


Figura 4. Técnica de PCR.

La sensibilidad de esta técnica es muy alta, pero presenta el problema de que no es cuantitativa y existe la posibilidad de tener falsos positivos por contaminación. Para solventar el problema de la cuantificación se ha generado una serie de variaciones a la técnica, conocidas en conjunto como PCR cuantitativa. El método de cuantificación estándar para PCR cuantitativa es la PCR en tiempo real (*real time PCR* o *quantitative PCR*), que puede realizarse mediante tres metodologías:

- *SYBRGreen*: se utiliza un marcador fluorescente que se une al ADN de doble cadena, de forma que la fluorescencia aumenta a la vez que se amplifica el ADN.
- *Sondas TaqMan*: este método se basa en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a la parte intermedia del ADN que queremos amplificar. A esta sonda se une una molécula de fluorescencia, de tal forma que cuando la sonda es desplazada de su sitio por la acción de la ADN polimerasa, la molécula fluorescente se libera y emite una fluorescencia al ser iluminada por láser (fig. 5).

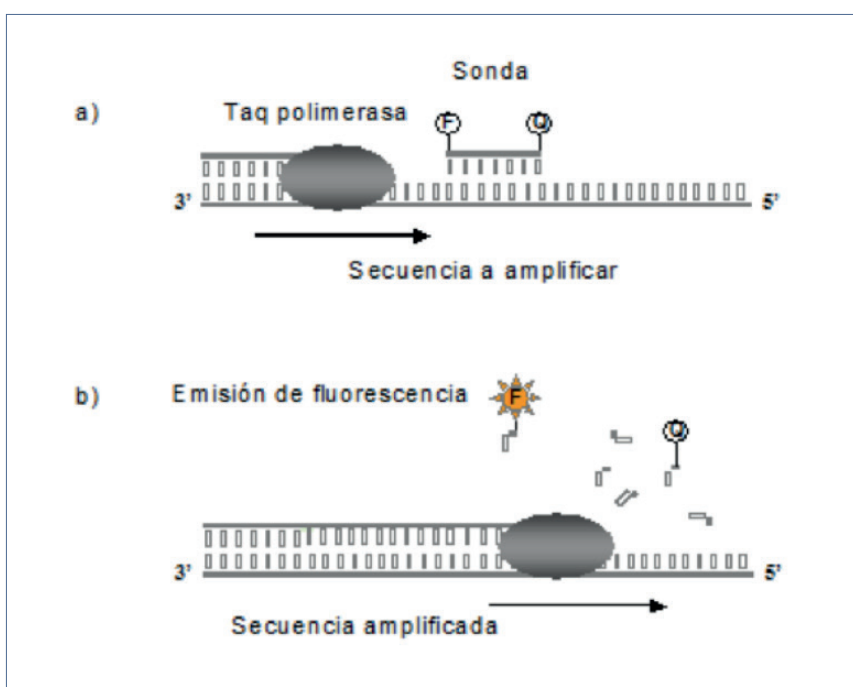


Figura 5. Técnica de RT-qPCR: emisión de fluorescencia⁷⁰.

- *Sondas de Light Cycler*: método basado en el uso de sondas con una molécula de fluorescencia, que es un potenciador de la señal. Se diseñan dos sondas complementarias al ADN problema y, una vez separadas, se emite una señal fluorescente basal, mientras que a medida que se vaya amplificando ADN problema, la cantidad de fluorescencia será potenciada, emitida y captada en cada ciclo de amplificación (fig. 6).

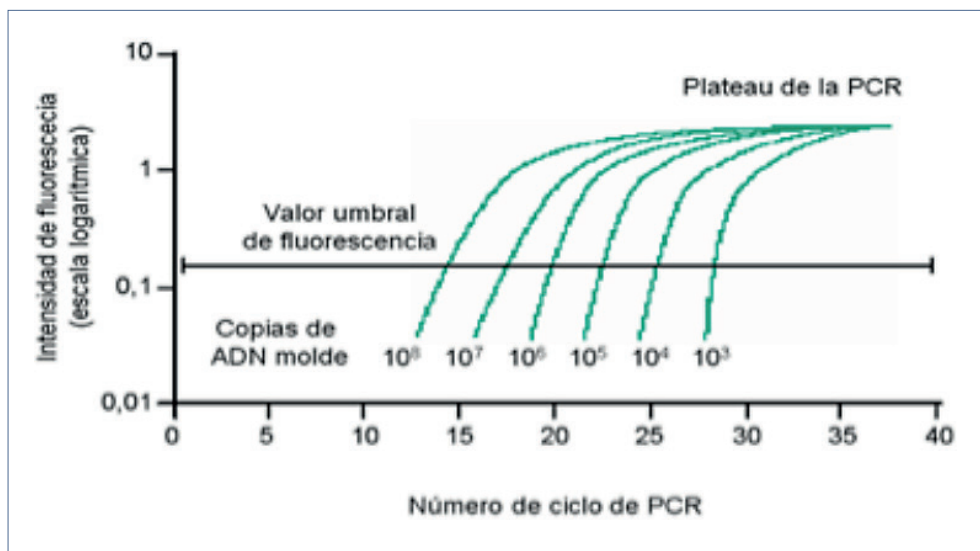


Figura 6. Técnica de RT-qPCR: relación entre cantidad de ADN y Ct.

La aparición a mediados de los años noventa de estas técnicas de alto rendimiento supuso una auténtica revolución en el análisis de la expresión génica. El primer trabajo con matrices de ADN fue un estudio publicado en 1995 en el que se analizaba simultáneamente la expresión de 48 genes⁶³. Tan solo un año después se publicaba el primer trabajo que aplicaba esta potente tecnología a la investigación en cáncer humano midiendo la expresión de más de mil genes al mismo tiempo⁷¹. Un estudio pionero y que sentó las bases en la investigación enfocada a la clínica utilizando las matrices de ADN fue el trabajo de Todd Golub et al., en el que consiguieron por primera vez clasificar a pacientes según los patrones de expresión génica⁷². Utilizaron el procedimiento de *Descubrimiento de clase* que les permitió distinguir entre leucemia mieloide aguda y leucemia linfoblástica y, posteriormente, aplicaron la *Predicción de clase* para clasificar nuevos tumores basándose solo en los datos de expresión génica.

4. SUBTIPOS MOLECULARES DE CÁNCER DE MAMA

Los trabajos desarrollados por el grupo de Noruega-Stanford permitieron confirmar la diversidad fenotípica del CM¹⁷, contribuyendo a la idea de que se trata de diferentes enfermedades individuales agrupadas bajo el término de CM⁷³. Inicialmente analizaron unos 8.000 genes mediante matrices de ADN y observaron que las diferencias en la expresión de 1.753 genes variaban mucho entre tumores de diferentes pacientes. A continuación, agruparon a las pacientes basándose en la expresión de 496 genes, a los que llamaron subgrupo de genes intrínsecos, ya que eran los que mostraban más variación entre muestras de diferentes pacientes al compararlas con muestras pareadas de la misma paciente. Esta clasificación presentaba dos subgrupos principales: RE+ y RE-. Los tumores RE+ se caracterizaban por la elevada expresión de muchos genes expresados por las células luminales de mama. Por otro lado, muchos de los genes expresados por el grupo RE- eran habitualmente expresados por las células epiteliales basales de mama. También se encontró un subgrupo que presentaba una muy elevada expresión de HER2, y genes asociados. Además, los tumores de este grupo tenían niveles de expresión muy bajos de RE y genes asociados, rasgo que compartían con los tumores basales. Por último, encontraron un subgrupo de tumores con expresión muy similar al tejido normal de mama, al que llamaron subtipo mama normal. Así, fueron capaces de identificar cuatro subgrupos: luminal (RE+), basal (en su mayoría, triples negativos), enriquecido en HER2 (HER2+ y RE+/-), y normal. Un análisis posterior subdividió al primer grupo en un subtipo luminal A y otro luminal B, presentando este último un peor pronóstico¹⁸. En el mismo trabajo se concluyó que los otros dos grupos (HER2 y basal) también tenían mal pronóstico. Los cinco subtipos fueron validados en series independientes⁷⁴, y parece que esta clasificación es consistente entre los tumores primarios y las lesiones a distancia que pueden aparecer años después⁷⁵.

La clasificación de cinco subtipos moleculares ha sido trasladada al formato de la PCR en tiempo real, tanto en tejido congelado (*Fresh Frozen*)⁷⁶ como en tejido fijado en formol y embebido en parafina (FFPE, en inglés *Formalin-fixed, paraffin embedded*)⁷⁷. Este último modelo predictivo basado en la expresión de 50 genes (PAM50) ha sido validado para su uso tanto en tejido *Fresh Frozen* como en tejido FFPE (<http://www.bioclassifier.com>)⁷⁸, y se encuentra comercializado. El test clasifica los tumores de las pacientes en cuatro grupos: uno

de bajo riesgo de recaída (luminal A), y tres de alto riesgo (luminal B, basaloide y enriquecido en HER2).

5. PLATAFORMAS MOLECULARES DE CÁNCER DE MAMA

5.1 MammaPrint®

A principios de 2002, un grupo de investigadores del Instituto Nacional del Cáncer Holandés (NKI, del inglés Netherlands Cancer Institute) publicó el primer trabajo en el que pacientes de CM eran estratificadas en dos grupos de alto y bajo riesgo de recaída a distancia en función de un perfil de expresión génica⁷⁹. Mediante matrices de ADN analizaron la expresión de ~25.000 genes en muestras de tejido *Fresh Frozen* obtenido de tumores primarios seleccionados retrospectivamente de una serie de 78 pacientes sin afectación ganglionar, menores de 55 años en el momento del diagnóstico y con tumores < 5 cm. Tras un proceso de depuración, el número óptimo de genes que permitía una clasificación exacta se fijó en 70.

La *firma de 70 genes* fue validada en una serie de 295 pacientes consecutivas con y sin afectación ganglionar⁸⁰. Este trabajo confirmó que la firma de 70 genes segregaba pacientes mejor que los factores clásicos, siendo incluso capaz de identificar a los de buen pronóstico en grupos clasificados de alto riesgo según las recomendaciones de consenso de St. Gallen y National Institutes of Health. En el análisis multivariante resultó ser mejor en la predicción de metástasis a cinco años que los demás factores clínicos independientes.

La verdadera primera validación independiente de este perfil génico fue publicada en 2006 por el grupo colaborativo internacional TRANSBIG⁸¹. Llevada a cabo en pacientes sin afectación ganglionar y mediante una matriz comercial que contenía 1.900 secuencias⁸², la firma de 70 genes resultó ser un factor neutral que añadía información pronóstica a los factores clínico-patológicos utilizados habitualmente. Con posterioridad, fue validada en pacientes con afectación ganglionar (1-3 ganglios afectos)⁸³ y de nuevo en pacientes sin afectación

ganglionar⁸⁴, además de en pacientes posmenopáusicas^{75,85}. Esta firma de 70 genes es la base del test MammaPrint®, aceptado por la Food and Drug Administration de EE. UU.

Recientemente se ha publicado el ensayo prospectivo *Microarray in Node-Negative Disease May Avoid Chemotherapy* (MINDACT)⁸⁶ que incluyó a 6.693 pacientes en las que el riesgo de recaída se estimaba tanto por factores clínico-patológicos tradicionales como por la firma de 70 genes (MammaPrint®). Cuando ambos métodos coincidían en la asignación de bajo riesgo, se evitaba la QT (estimado en un 10% de pacientes); cuando coincidían en la asignación de alto riesgo, se administraba QT (estimado en un 55%), y cuando el resultado era discordante (estimado en un 35%), la paciente se aleatorizaba para seguir la recomendación marcada, bien por el método clínico-patológico, bien por MammaPrint®.

Los resultados muestran que muchas pacientes de CM en estadio temprano sin ganglios axilares o con hasta tres ganglios afectados pueden evitar de forma segura la QT adyuvante a partir del análisis de la biología de su enfermedad. Un 46% de las enfermas clasificadas de alto riesgo por el método clínico eran reclasificadas como de bajo riesgo mediante MammaPrint®. En este grupo, la supervivencia libre de metástasis a cinco años fue del 94%, con independencia de que recibiesen o no QT.

5.2 Oncotype DX®

Este perfil génico ha sido desarrollado mediante la técnica RT-qPCR analizando de forma prospectiva muestras archivadas de pacientes participantes en ensayos clínicos del consorcio estadounidense *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*. Desarrollaron el modelo predictivo en 447 pacientes obtenidas del ensayo B-20 y lo validaron en 668 provenientes del ensayo B-14, en ambos casos pacientes con tumores RE+ y sin ganglios afectados tratadas con tamoxifeno⁸⁷. En la etapa de desarrollo del modelo, analizaron la expresión de 250 genes relacionados con cáncer y generaron un algoritmo basado en la expresión de 21 genes. El algoritmo, llamado índice de recaída (IR), clasificaba a las pacientes según su riesgo de recaída a distancia a diez años. En el primer estudio de validación el modelo clasificó al 51%

de las pacientes en un grupo de bajo riesgo ($IR \leq 18$), al 22% como de riesgo intermedio ($18 \geq IR > 31$), y al 27% como de alto riesgo ($IR \geq 31$). Un estudio de casos y controles de base poblacional llevado a cabo con pacientes similares que no habían recibido QT confirmó estos resultados, demostrando la asociación entre el IR y el riesgo de muerte por CM⁸⁸. Basándose en estos dos estudios de validación, se desarrolló un ensayo comercial llamado Oncotype DX[®], que ha sido aprobado por la *Clinical Laboratory Improvement Amendments* (CLIA) para pacientes sin afectación ganglionar y RE+⁸⁹.

También se demostró que las pacientes con un IR alto obtenían mayor beneficio al ser tratadas con QT adicional a la terapia hormonal, no así aquellas que presentaban riesgo bajo e intermedio, que solo parecían favorecidas por el tratamiento hormonal⁹⁰.

El valor de la terapia adyuvante obtenido en el grupo intermedio seguirá siendo incierto hasta que se comuniquen los resultados del ensayo fase III *Trial Assigning Individualized Options for Treatment* (TAILORx). Se han comunicado los resultados de este ensayo en cuanto el grupo de riesgo bajo: el 99% de las mujeres con resultados bajos de Oncotype DX[®]⁹¹. En este ensayo, las pacientes operadas de un tumor RE+ y sin afectación ganglionar son asignadas a un tratamiento según su riesgo de recaída determinado por el IR: las pacientes de bajo riesgo reciben HT, las de alto riesgo, QT y HT y, las de riesgo intermedio se aleatorizan a recibir solo hormonas o QT más hormonas. Con la intención de minimizar la posibilidad de un tratamiento subóptimo en los grupos de alto riesgo y del grupo aleatorizado se han redefinido los grupos de riesgo: bajo (< 11); intermedio (≥ 11 $IR < 25$); y alto (≥ 25).

5.3 EndoPredict[®]

La prueba EndoPredict[®] es un test genómico desarrollado en Alemania a partir de 964 muestras de tumores con receptores hormonales positivos y HER2 negativo. El estudio analizó la influencia de más de 20.000 genes. Se identificaron doce genes relevantes a efectos de decisión terapéutica que ofrecían información más detallada sobre el grado de agresividad del tumor⁹². A partir del nivel de actividad de dichos genes, se calcula una puntuación (puntuación EP o EndoPredict[®]) mediante una fórmula matemática que evalúa los resultados

en una escala del 0 al 15. Una puntuación por encima de 5 indica que la paciente pertenece a un grupo de alto riesgo^{93,94}.

EndoPredict® también tiene en cuenta los dos factores de pronósticos clínicos más importantes: el tamaño del tumor y el estado de los ganglios linfáticos. Combinando esta información con la puntuación EP se obtiene la puntuación EPclin. Una vez definidos los genes de interés mediante el estudio de identificación y después de desarrollar las fórmulas de cálculo, la eficacia del test se evaluó en dos ensayos clínicos independientes efectuados por el Grupo Austriaco de Estudio del Cáncer de Mama y Colorrectal (ABCSG, del inglés *Austrian Breast & Colorectal Cancer Study Group*)⁹⁵. Todas las pacientes (1.702) que participaron en los estudios se trataron exclusivamente con HT, prescindiendo de QT. Las mujeres de bajo riesgo mostraron una tasa del 5% de metástasis a distancia a los diez años

La validación del test también se ha realizado en tumores con ganglios positivos, siendo el principal estudio la validación clínica prospectiva-retrospectiva en el ensayo GEICAM 9906⁹⁶, donde se incluyeron 1.246 pacientes aleatorizadas entre dos esquemas de QT. Los autores concluyeron que EndoPredict® es un parámetro pronóstico independiente en la población analizada.

5.4 Prosigna® (PAM50)

PAM50 es un test basado en la expresión de 50 genes y que clasifica los tumores en uno de los siguientes subtipos moleculares: luminal A, luminal B, HER2 enriquecido y basal⁹⁷. Prosigna® se desarrolla a partir de la firma genética PAM50 y aporta información del riesgo de recurrencia de la paciente. Incluye el tamaño del tumor, el subtipo molecular intrínseco y el estado de proliferación del tumor. El riesgo de recurrencia es la forma genómica de estadificación que incorpora la expresión génica del tumor a la información clásica de estadificación TNM. La prueba ha sido validada en dos estudios clínicos que incluyen más de 2.400 mujeres posmenopáusicas con CM en fases iniciales: el estudio TransATAC y el estudio del ABCSG-8.

La investigación TransATAC se basó en el ensayo ATAC, que evaluaba el tratamiento adyuvante con anastrozol frente a tamoxifeno. El resultado del estudio mostró que PAM50 añadía

información pronóstica significativa a la aportada por los parámetros clínico-patológicos en todos los subgrupos considerados⁹⁸.

En el estudio ABCSG-8, también de adyuvancia, las pacientes recibieron tamoxifeno o tamoxifeno seguido de anastrozol⁹⁹, todas sin QT, y disponía de un seguimiento a diez años cuando las muestras se analizaron mediante PAM50. Los resultados confirmaron la hipótesis de que el test agrega valor pronóstico para predecir la recurrencia a distancia por encima de las variables clínicas estándares.

TtransATAC y ABCSG-8 demostraron el valor pronóstico independiente de PAM50, más allá de lo aportado por las características clínicas y patológicas (estado de los ganglios, tamaño tumoral y grado, edad y tratamiento) en poblaciones muy amplias de mujeres con CM RE+¹⁰⁰.

5.5 8-gene Score

El grupo de investigación del Hospital Universitario La Paz (HULP) demostró que la plataforma *TaqMan arrays* era tan fiable como las matrices de ADN para determinar el perfil génico MammaPrint^{®101}. Después, evidenciaron que con esta plataforma se obtienen resultados comparables a MammaPrint[®] y Oncotype DX[®] empleando muestras conservadas en parafina¹⁰². Finalmente, el grupo generó un perfil génico propio, el 8-gene Score, centrado en el grupo de tumores con RE positivos¹⁰³.

El 8-gene Score clasifica a las pacientes con CM localizado según tengan un riesgo alto o bajo de desarrollar metástasis: el grupo de bajo riesgo supone, aproximadamente, el 60% de las pacientes, frente a un 40% del grupo de alto riesgo. Los genes son analizados mediante una plataforma denominada *TaqMan arrays*, del laboratorio Life Technologies. En el grupo de bajo riesgo la supervivencia sin recaída al cabo de diez años es próxima al 100%.

El 8-gene Score no está listo para su uso en la rutina clínica, puesto que para ello es necesaria una autorización. Validar supone aplicar el perfil en un número elevado de casos para comprobar que funciona correctamente.

6. DIFERENTES VALORES PRONÓSTICOS DE LAS PLATAFORMAS GÉNICAS

El CM es una enfermedad heterogénea que está compuesta por diferentes subtipos biológicos, con diferentes diagnósticos. Los factores pronósticos deben proporcionar una información prospectiva de la evolución de cada paciente para orientar la decisión terapéutica según el riesgo de recaída. Las características ideales que debe reunir un factor pronóstico son: sencillez, sensibilidad y reproducibilidad.

El desarrollo de las técnicas genómicas, con la capacidad de medir cientos o miles de genes, ha supuesto la identificación de perfiles pronósticos basados en la biología, dando lugar a la validación y a la utilización en la práctica clínica de varias plataformas, como ya hemos descrito. Estas no han reemplazado a los factores clínicos y patológicos clásicos, sino que los complementan.

Estamos llegando a una época gobernada por la medicina personalizada, que utiliza, entre otras herramientas, el diagnóstico genómico para asignar un tratamiento. Una cuestión importante es en qué pacientes merece la pena emplear este tipo de herramientas. Las guías internacionales las integran para tomar decisiones en tumores precoces RH+ HER2-, con tamaño > 0,5 mm y sin afectación ganglionar o con micrometástasis (N1mic)^{8,104}.

Varios estudios han tratado de valorar el impacto clínico que tienen estas plataformas genómicas en la decisión del tratamiento adyuvante del CM precoz¹⁰⁵⁻¹²⁸. Se trata de trabajos muy diferentes entre sí, en su mayoría retrospectivos y que no suelen comparar varias plataformas. Si nos fijamos en estudios con grandes series^{111,125,127,128}, de forma conjunta se comprueba que la probabilidad de cambio en la recomendación de tratamiento tras el test se eleva hasta el 42%. El cambio en la pauta de QT más hormonas a hormonas solas se produjeron en el 30% de las pacientes, y al contrario en un 11 %. Con independencia del porcentaje exacto de cambio, se puede asegurar que las plataformas genómicas reducen considerablemente el empleo de QT adyuvante en el CM precoz.

El beneficio de todo ello valorado en coste-efectividad de los diferentes perfiles en relación con el tratamiento estándar muestra en todos ellos una mejora en la supervivencia y supervivencia

ajustada a la calidad de vida, gracias a que se evita la QT en un porcentaje apreciable de pacientes^{129,130}.

El problema fundamental es que los resultados de los múltiples estudios publicados son muy dispares, que crea una incertidumbre sobre estos y sobre las decisiones terapéuticas que se derivan.

A pesar de que todas las plataformas génicas comentadas tienen un mismo propósito —la definición de un grupo de bajo riesgo de CM que pueda evitar la QT adyuvante— sus resultados no son superponibles. Varios trabajos que comparaban resultados han reportado, de hecho, un nivel bajo de concordancia¹³¹⁻¹³⁴, lo cual añade un factor de incertidumbre a la hora de tomar decisiones terapéuticas. Las peculiaridades tecnológicas inherentes a cada plataforma y la heterogeneidad de las poblaciones analizadas han sido los argumentos esgrimidos para dar cuenta de esta disparidad.

El motivo de esta tesis es comparar el rendimiento del 8-gene Score frente al de MammaPrint® y el de Oncotype DX®.

Tesis doctoral

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

La decisión de administrar QT adyuvante tras la cirugía de un CM depende del riesgo de recaída. Este se estima con factores clínicos y patológicos, pero en muchos casos estos no aportan la suficiente precisión. Debido a ello, se recurre a los perfiles génicos como herramienta complementaria para determinar el riesgo.

El grupo de investigación del HULP desarrolló la plataforma 8-gene Score, que en los primeros trabajos parece tan fiable como otros perfiles génicos comercializados para clasificar a las pacientes en grupos de alto y bajo riesgo de recaída. Estudios previos de comparación entre plataformas han comunicado tasas elevadas de discordancia, que podrían disminuirse seleccionando una población uniforme de pacientes y empleando siempre el mismo tipo de muestra (en este caso, FFPE)¹³².

La hipótesis de trabajo de esta tesis es que 8-gene Score debe ofrecer un resultado concordante con el de las plataformas Oncotype DX® y MammaPrint® para determinar el riesgo de recaída de las pacientes operadas de un carcinoma localizado de mama.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL:

Analizar la concordancia de 8-gene Score con otros dos perfiles génicos comerciales de uso habitual (Oncotype DX® y MammaPrint®).

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Concordancia entre los datos pronósticos clínico-patológicos clásicos (tamaño, estado de ganglios axilares, RP, grado histológico, infiltración linfovascular y Ki67%) y los perfiles génicos Oncotype DX®, MammaPrint® y 8-gene Score.
2. Correlación de la expresión de RE, RP y HER2 mediante IHQ y expresión génica de Oncotype DX® y MammaPrint®.
3. Porcentaje de cambio de la decisión terapéutica entre los factores clínico-patológicos clásicos y Oncotype DX® o MammaPrint®.
4. Porcentaje del cambio de la decisión de la actitud terapéutica con 8-gene Score en los Hospitales Universitarios Ramón y Cajal (HRyC), La Paz (HULP) y Basurto (HBAS).

Tesis doctoral

MATERIAL Y MÉTODOS

1. PACIENTES Y DATOS CLÍNICOS

Este estudio retrospectivo incluye a 221 pacientes diagnosticadas de un CM en el HRyC (82 pacientes), HULP (39 pacientes) y HBAS (100 pacientes) entre enero de 2012 y diciembre de 2015. Los tumores eran infiltrantes en estadio I o II, según la clasificación TNM del año 2002, con RE y/o RP positivos y HER 2 negativo. En todos los casos se había solicitado un perfil génico dentro de la práctica habitual de cada centro y se cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión reflejados en la tabla 6. Todas las pacientes debían haber realizado tratamiento quirúrgico apropiado según los protocolos del momento (se admitieron mastectomía, cirugía conservadora, linfadenectomía y/o biopsia selectiva de ganglio centinela).

Así mismo, debían disponer del mismo bloque de tumor conservado en parafina donde se había realizado el perfil génico y datos suficientes en su historia clínica.

Tabla 6. Criterios de inclusión y exclusión de pacientes de estudio

Criterios de inclusión
1. Mujeres diagnosticadas de carcinoma infiltrante de mama
2. Tumor localizado: pT1-2, pN0 o pN1mic, en ausencia de metástasis a distancia
3. Tratamiento local correcto. Debía haber consistido en una cirugía conservadora seguida de radioterapia o en una mastectomía. Además, se debía haber evaluado el estado de los ganglios axilares, bien mediante linfadenectomía completa o mediante la técnica del ganglio centinela
4. Receptores hormonales positivos, ya sean de estrógenos, progesterona o ambos. Para este trabajo se consideraron positivos los tumores con cualquier grado de expresión que hubieran llevado al médico responsable a prescribir tratamiento hormonal adyuvante
5. Ausencia de sobreexpresión de HER2. Si no estaba disponible, se solicitaba al servicio de anatomía patológica del centro de referencia la realización de una prueba diagnóstica (Herceptest o FISH)
6. Haber realizado a la paciente previamente un test comercial: MammaPrint® u Oncotype DX®
7. Disponibilidad de muestra apropiada del tumor primario conservada en parafina. Siempre que fue posible se empleó el mismo bloque sobre el que se realizó el test comercial
8. Firma de consentimiento informado por parte de la paciente
Criterios de exclusión
1. Administración de quimioterapia neoadyuvante
2. Positividad para HER2
3. Histologías minoritarias: papilar, medular, comedocarcinoma
4. Datos clínicos incompletos
5. Muestra tumoral en mal estado de conservación o en cantidad insuficiente para realizar la extracción de ARN
6. No disponibilidad del resultado del test co

Las características clínicas y anatomo-patológicas que se recogieron de manera retrospectiva fueron:

- Datos de la paciente:
 - Edad
 - Estado menopáusico al diagnóstico
- Datos del tumor:
 - Fecha del diagnóstico
 - Histología (ductal o lobulillar)
 - Estadío patológico
 - Receptores hormonales
 - HER2
 - Grado de diferenciación

- Ki67
- Presencia o ausencia de micrometástasis
- Datos del test comercial:
 - Test realizado
 - Receptores hormonales
 - HER2
 - Resultado del test
- Valoración del facultativo: ¿el resultado del test influyó en la decisión acerca del tratamiento?
- Datos del seguimiento:
 - Tratamiento adyuvante
 - Fecha de la última revisión
 - Existencia de recaída a distancia
 - Situación de la paciente en la última revisión

Las pacientes fueron seleccionadas de forma retrospectiva. Tras verificar que cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión, se contactó telefónicamente con ellas para pedir el consentimiento informado de cesión de muestra al biobanco del hospital correspondiente. Con posterioridad se recogieron los datos clínicos a través de los miembros del equipo pertenecientes a los servicios de oncología médica de los centros participantes.

Los patólogos de cada centro participante realizaron una revisión y selección de las muestras FFPE. El traslado de las muestras biológicas se hizo directamente por parte del equipo de Oncología y Patología Molecular del HULP.

2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

La extracción del ARN de las 221 muestras y la síntesis del ADN complementario (ADNc) se llevó a cabo en el laboratorio del grupo del HULP.

La medición de la expresión génica por RT-qPCR y la lectura de los *TaqMan arrays* se llevó a cabo en el Parque Científico de Madrid. Posteriormente, el análisis de concordancia del 8-gene Score con los perfiles génicos comerciales que se están empleando en la actualidad se realizó con el apoyo del Servicio de Bioestadística de la Unidad de Investigación del HULP.

3. AISLAMIENTO DE ARN Y SÍNTESIS DE ADNc

El trabajo fue realizado sobre muestras tumorales conservadas en parafina. Se revisaron preparaciones de hematoxilina-eosina para seleccionar biopsias en las que al menos el 70% de las células fueran tumorales. De cada muestra se obtuvieron cinco cortes de 10 μm que después se desparafinaron con xileno y se lavaron con etanol 100%.

El ARN fue extraído y purificado con el kit RecoverAll™ (Ambion®) siguiendo el protocolo del fabricante, y tras ello se procedió a su caracterización cuantitativa y cualitativa mediante espectrofotometría UV, midiendo la absorbencia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop.

A continuación fue preciso transformar este ARN en ADNc para su posterior amplificación. En la síntesis de ADNc se utilizó el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems®). En nuestro estudio decidimos abordar la síntesis de ADNc a partir de 1 μg de ARN total de cada una de las muestras. La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo siguiendo el protocolo del kit y empleando hexámeros al azar como cebadores.

4. ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-QPCR

Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en un termociclador *ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems®). Como soporte se utilizaron las tarjetas microfluídicas, denominadas *TaqMan arrays*, diseñadas por la misma compañía. En cada uno de los puertos de la tarjeta microfluídica se introdujo un volumen final de 100 µL, 50 µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix* y 50 µL del ADNc equivalente a 100 ng del ARN total. La expresión de cada gen se midió por triplicado.

Se excluyeron las muestras con un porcentaje de células tumorales menor del 70%, con ARN insuficiente (menor de 1 µg) o con señal escasa tras RT-qPCR (ciclo de cuantificación [Cq] medio > 35).

5. MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE 8-GENE SCORE

Durante la RT-qPCR se midió el Cq de cada uno de los genes estudiados en cada muestra mediante el *software* SDS 2.4.1 (Life Technologies®)¹³⁵. El valor máximo de Cq se estableció en 40 y los valores obtenidos se recogieron en una tabla de Microsoft Excel para cálculos posteriores.

Con intención de evitar la variabilidad experimental de la RT-qPCR, se llevó a cabo la normalización de cada Cq (ΔCq) con los cuatro genes de referencia (IPO8, HMBS, POLR2A y SDH). Así, la expresión de cada gen de interés se presenta en relación con un factor de normalización, que consiste en la media geométrica del Cq de los genes de referencia.

$$\Delta Cq = FN - Cq \text{ (gen estudiado)}$$

La expresión normalizada fue ajustada tomando como 0 el menor valor de expresión, de manera que un aumento de una unidad en la expresión reflejara aproximadamente una duplicación en la cantidad de ARN⁸⁷.

6. MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE ONCOTYPE DX®

El test Oncotype DX®, se realiza en un laboratorio con certificación de calidad CLIA de la empresa Genomic Health.

Primero extrae y purifica el ARN de la muestra FFPE y se procesa con una DNAasa I. Posteriormente, se mide la cantidad y calidad de ARN y se comprueba la contaminación de ADN. Una vez superados estos controles de calidad, se analiza la expresión de 21 genes mediante RT-qPCR, utilizando la metodología de sonda TaqMan.

La expresión de veintiún genes se determina por triplicado y se normaliza con relación a un conjunto de cinco genes de referencia, que forman parte de los veintiún genes totales¹³⁶. Finalmente, se calcula el resultado final del IR mediante una fórmula específica (fig. 7).

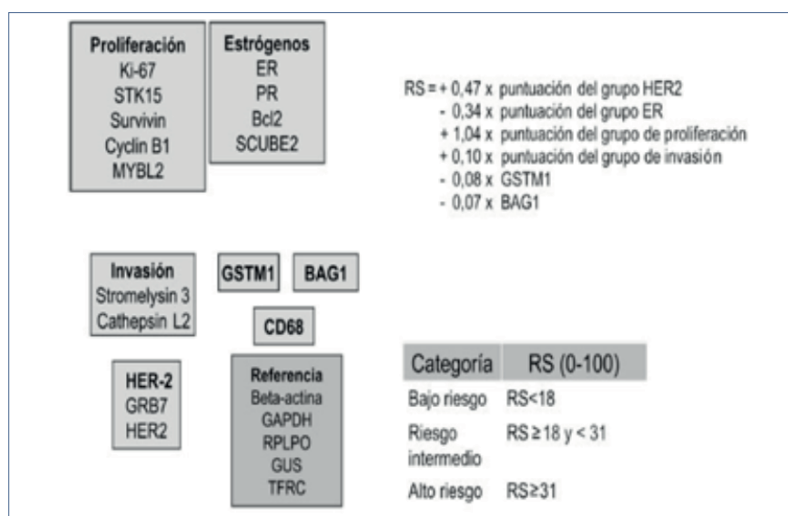


Figura 7. Cálculo del IR. A los valores de expresión de los diferentes genes se les asigna un valor matemático y la suma de estos constituye el índice de recurrencia.

7. MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MAMMAPRINT®

El test MammaPrint® fue el primer test genómico aprobado por la Food and Drug Administration, desarrollado por la científica holandesa Laura van't Veer, de Agendia. En la primera publicación⁷⁹ se describe la técnica, en la cual se analizaron 226 muestras frescas. El material tumoral era fresco y se sometió a congelación rápida en nitrógeno líquido en el periodo de una hora tras cirugía. Los cortes congelados se tiñeron con hematoxilina-eosina y se seleccionaron únicamente las muestras en las que había más de un 50% de células tumorales. Se utilizaron 30 cortes de 30 µm para el aislamiento del ARN. Se generó ARNc mediante transcripción *in vitro* con ARN polimerasa T7 y 5 µg de ARN total y se marcó con Cy3 o Cy5. Cinco microgramos del ARNc marcado con Cy de un tumor mamario se mezclaron con la misma cantidad de producto marcado con Cy del color contrario procedente de una mezcla constituida por la misma cantidad de ARNc de cada paciente.

Los ARNc marcados se fragmentaron hasta un tamaño medio de aproximadamente 50 a 100 nucleótidos calentando las muestras a 60 °C en presencia de 10 mM de cloruro de cinc y añadiendo un tampón de hibridación que contenía cloruro sódico 1M, sarcosina (N-metilglicina) sódica al 0,5%, 50 mM de ácido morfolinoetano-sulfónico (pH: 6,5) y formamida (concentración final: 30% a 40 °C); el volumen final fue de 3 ml. Las *microarrays* incluían los 24.479 oligonucleótidos biológicos y 1.281 sondas de control. Tras la hibridación, se lavaron los portaobjetos y se exploraron con un escáner láser confocal (Agilent Technologies). Se cuantificaron las intensidades de fluorescencia en las imágenes escaneadas y se corrigieron los valores para el nivel de fondo, y se normalizaron. En ambos grupos se analizaron los 25.000 genes del genoma humano, identificando las diferencias existentes en la expresión génica. Finalmente, se publicó la firma de 70 genes capaz de pronosticar la evolución de la enfermedad con mayor precisión que las variables convencionales.

Con posterioridad, se validó en tejido parafinado, con una tasa de concordancia del 95%, justificando el 5% de discrepancia por la heterogeneidad tumoral¹³⁷.

La determinación de MammaPrint® está centralizada, lo que permite una mayor homogeneidad de los resultados.

8. ESTADÍSTICA

El estudio descriptivo de la muestra se ha realizado de forma global y desglosada según la clasificación de riesgo en función de la prueba realizada (MammaPrint® u Oncotype DX®). Las variables categóricas se describen mediante sus frecuencias absolutas y relativas. Las variables numéricas, a través de la media y la desviación estándar y los valores mínimo y máximo.

Para el análisis de concordancia entre 8-gene Score con MammaPrint® y Oncotype DX® se ha calculado la proporción de acuerdos observados y el índice kappa. La proporción de acuerdos observados es un índice muy intuitivo y fácilmente interpretable: tomará valores entre 0 (total desacuerdo) y 1 (máximo acuerdo). Sin embargo, como indicador de reproducibilidad tiene el inconveniente de que aun en el caso de que las dos pruebas clasifiquen con criterios independientes se produciría un cierto grado de acuerdo por azar. Para tener en cuenta este hecho, se ha calculado el índice kappa que indica el grado de acuerdo que existe por encima del esperado por azar.

Landis y Koch propusieron la siguiente tabla de valoración del índice k:

Kappa	Grado de acuerdo
< 0,00	sin acuerdo
> 0,00-0,20	insignificante
0,21-0,40	discreto
> 0,41-0,60	moderado
0,61-0,80	sustancial
0,81-1,00	casi perfecto

Se realizaron contrastes de hipótesis para evaluar la asociación estadística entre los factores pronóstico y la clasificación de riesgo según 8-gene Score, MammaPrint® y Oncotype DX®. Para las variables categóricas se utilizó el test de Chi-cuadrado o el estadístico exacto de Fisher, si la frecuencia esperada en alguna de las casillas era < 5.

Para evaluar el cambio en la decisión terapéutica se describieron los resultados mediante las frecuencias absolutas y relativas de la decisión inicial, y la decisión final tras conocerse el

resultado de la prueba realizada. Los resultados se muestran tanto en forma tabular mediante tablas de contingencia, como gráficamente mediante gráficos de sectores y barras.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el *software* Stata/IC 14.1 (StataCorp. 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP).

Tesis doctoral

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA DEL ESTUDIO

Las características clínicas y anatomo-patológicas de las 221 pacientes incluidas en el estudio se describen en la tabla 7. La media de edad fue de 57,2 años (rango: 33-78). Del total, 159 pacientes (72,3%) eran posmenopáusicas. 177 (81,2%) tenían un tamaño tumoral < 2 cm (T1) y 171 (78,4%) no tenían afectación ganglionar. Había 31 tumores pobremente diferenciados (14,1%). En el 100% de los casos la expresión de receptores estrogénicos fue positiva, mientras que la de RP fue positiva en el 87,7%. No se incluyeron pacientes con tumores T3 o N1-2 o con receptores hormonales negativos.

Tabla 7. Descriptiva de los pacientes

Variable	n	%
Edad*	221	57,2 (9,2) 33-78
Premenopausia		
No	159	72,3
Sí	61	27,7
T		
1	177	81,2
2	41	18,8
N		
0	171	78,4
1	47	21,6
Grado		
I	49	22,3
II	139	63,2
III	31	14,1
ER		
Negativo	0	0
Positivo	221	100
Ki67		
Positivo (< 20%)	124	56,9
Positivo (≥ 20%)	94	43,1
RP		
Negativo	27	12,3
Positivo (< 20%)	23	10,5
Positivo (≥ 20%)	170	77,3
ILV		
No	97	87,4
Si	14	12,6
Mammaprint® (n = 121)		
Bajo riesgo	66	54,6
Alto riesgo	55	45,5
Oncotype DX® (n = 100)		
Bajo riesgo	86	86,0
Alto riesgo	14	14,0

*Media (de) min-máx.

En 121 pacientes provenientes del HRyC y HULP se realizó la plataforma génica de MammaPrint®, mientras que en 100 pacientes del HBAS la plataforma empleada fue Oncotype DX® (fig. 8). El resultado de alto riesgo apareció en 55 de los 121 casos analizados con MammaPrint® (45,5%) y en solo 3 de los 100 analizados con Oncotype DX®. Este último resultado de alto riesgo se obtuvo situando el punto de corte de en un $RS \geq 31$. Si se empleaba un punto de corte de 25, como en el estudio TAILORx⁹¹ aparecían 14 pacientes de alto riesgo y 86 de bajo riesgo (tabla 9). En la tabla 8 se reflejan los resultados con los puntos de corte convencionales.

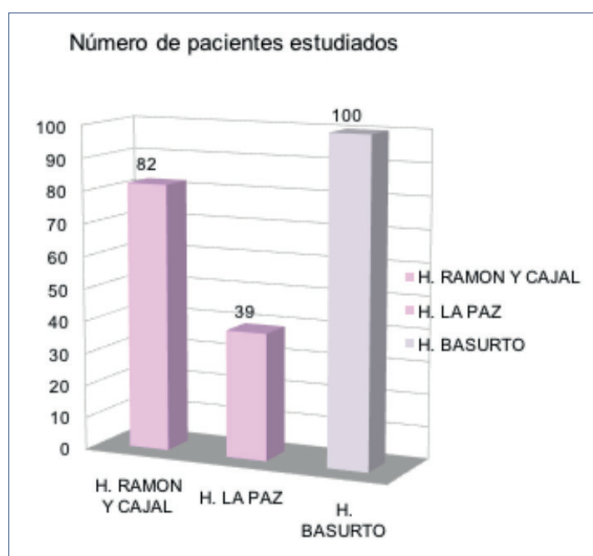


Figura 8. Número de pacientes y plataformas génicas realizadas en los tres hospitales de estudio.

Tabla 8. Resultados del Oncotype DX® estratificados en $RS < 0$ o > 25

Clasificación de Oncotype® por categorías		
Oncotype	Freq.	Porcentaje
Bajo	86	86
Alto	14	14
Total	100	100

Tabla 9. Resultados del OncoType DX® estratificados en RS bajo: ≤ 18 ; intermedio: 19-30; alto: ≥ 31

Clasificación de Oncotype® por categorías		
Oncotype	Freq.	Porcentaje
Bajo	51	51
Intermedio	46	46
Alto	3	3
Total	100	100

2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA PLATAFORMA MAMMAPRINT®

De los 121 casos analizados con MammaPrint® (tabla 10), 66 fueron de bajo riesgo y 55 de alto riesgo. Las medias de edad de las pacientes fueron 56 y 57 años, respectivamente. En ambos casos, dos tercios de las enfermas eran posmenopáusicas y tampoco hubo diferencia en cuanto a la expresión de RP.

Un Ki67 elevado fue más frecuente entre las pacientes con tumores de alto riesgo. Los tumores de grado III también predominaron en la población de alto riesgo. La infiltración linfovascular estuvo presente en un 10,3% de las pacientes de bajo riesgo y un 15,1% de las de alto riesgo.

El 16,7% de las pacientes de bajo riesgo acabaron recibiendo QT adyuvante, frente a un 80% de las de alto riesgo (fig. 9).

Tabla 10. Descriptiva según clasificación del riesgo de MammaPrint®

Variable	Resultado MammaPrint®	
	Bajo riesgo (n = 66)	Alto riesgo (n = 55)
	n (%)	n (%)
Edad*	56,3 (9,8) 33-72	57,1 (8,9) 36-73
Premenopausia		
No	47 (71,2)	41 (74,6)
Sí	19 (28,8)	14 (25,5)
T		
1	53 (81,5)	39 (73,6)
2	12 (18,5)	14 (26,4)
N		
0	54 (84,4)	41 (75,9)
1	10 (15,6)	13 (24,1)
Grado		
I	19 (28,8)	4 (7,3)
II	40 (60,6)	31 (56,4)
III	6 (9,1)	20 (36,4)
RE		
Negativo	0 (0)	0 (0)
Positivo	66 (100)	55 (100)
Ki67		
< 20%	53 (82,8)	21 (38,9)
≥ 20%	11 (17,2)	33 (61,1)
RP		
Negativo	10 (15,4)	9 (16,4)
Positivo (< 20%)	7 (10,8)	4 (7,3)
Positivo (≥ 20%)	48 (73,9)	42 (76,4)
ILV		
No	52 (89,7)	45 (84,9)
Sí	6 (10,3)	8 (15,1)
Quimioterapia		
No	55 (83,3)	11 (20,0)
Sí	11 (16,7)	44 (80,0)

*Media (de).

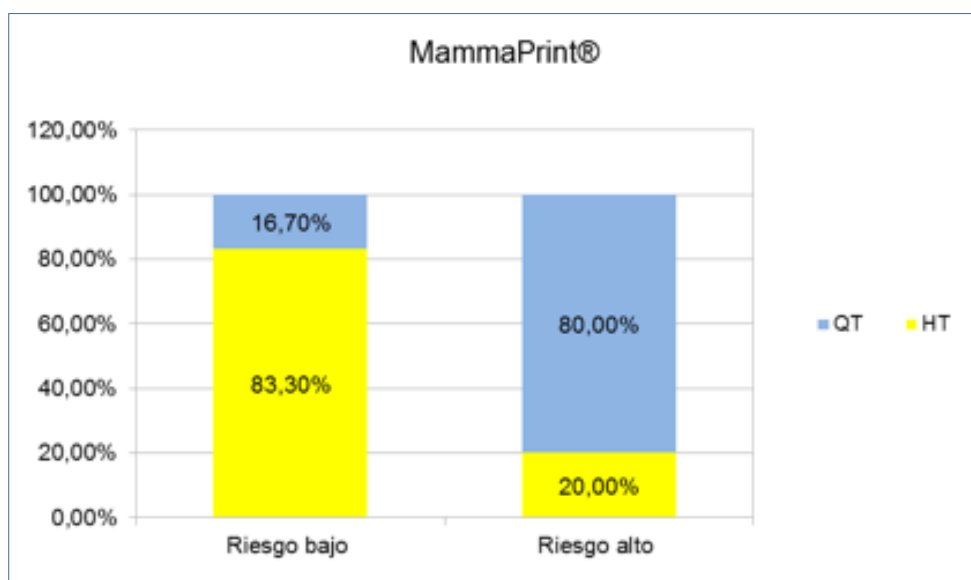


Figura 9. Gráfica representativa de la opción de tratamiento recibido en función del resultado de MammaPrint®.

3. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA PLATAFORMA ONCOTYPE DX®

De las 100 pacientes cuyos tumores se analizaron con Oncotype DX®, solo había tres de alto riesgo si se aplicaba el punto de corte clásico > 31 (tabla 9).

Siguiendo el criterio empleado en el ensayo TAILORx^{82,91}, se dicotomizó a la población de manera que un índice de 25 o superior definía al grupo de alto riesgo. Quedaron 14 pacientes.

Las características de las pacientes están representadas en la tabla 11. La media de edad fue de 58 años. El 70,6% de bajo riesgo eran posmenopáusicas, y el 78,6%, de las de alto riesgo. El 35,7% las pacientes de alto riesgo tenían afectación ganglionar, y el 22,1% de las de bajo riesgo.

Los RP fueron negativos en el 28,6% de las de alto riesgo. El grado III estuvo presente en el 4,7% de las pacientes de bajo riesgo y en el 7,1% de las de alto riesgo. El Ki67 elevado aparecía en el 45,4% del grupo de bajo riesgo y en el 78,6% del de alto riesgo.

Como en la plataforma MammaPrint®, no todas las pacientes recibieron el tratamiento en función de los resultados de la prueba génica. En este caso, 7 pacientes (8,1%) de bajo riesgo recibieron QT, mientras que 7 (50%) de alto riesgo no la recibieron (fig. 10).

Tabla 11. Descriptiva según clasificación del riesgo de Oncotype DX®

Variable	Resultado Oncotype DX®	
	Bajo riesgo (n = 86)	Alto riesgo (n = 14)
	n (%)	n (%)
Edad*	57,7 (8,9) 38-78	59,2 (9,4) 42-73
Premenopausia		
No	60 (70,6)	11 (78,6)
Sí	25 (29,4)	3 (21,4)
T		
1	72 (83,7)	13 (92,9)
2	14 (16,3)	1 (7,1)
N		
0	67 (77,9)	41 (75,9)
1	19 (22,1)	5 (35,7)
Grado		
I	23 (27,1)	3 (21,4)
II	58 (68,2)	10 (71,4)
III	4 (4,7)	1 (7,1)
RE		
Negativo	0 (0)	0 (0)
Positivo	86 (100)	14 (100)
Ki67		
< 20%	47 (54,7)	3 (21,4)
≥ 20%	39 (45,4)	11 (78,6)
RP		
Negativo	4 (4,7)	4 (28,6)
Positivo (< 20%)	9 (10,5)	3 (21,4)
Positivo (≥ 20%)	73 (84,9)	7 (50,0)
Quimioterapia		
No	79 (91,9)	7 (50,0)
Sí	7 (8,1)	7 (50,0)

*Media (de).

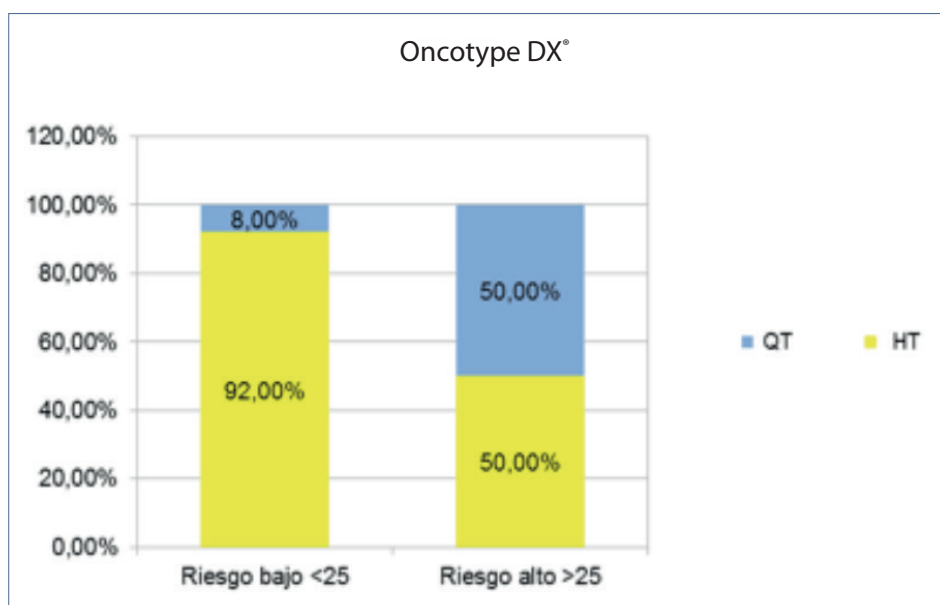


Figura 10. Gráfica representativa de la opción de tratamiento recibido en función del resultado de Oncotype DX®.

4. ANÁLISIS DE LA CONCORDANCIA DE 8-GENE SCORE CON MAMMAPRINT®

El resultado de MammaPrint® y 8-gene Score coincidió en el 51 % de los casos (tabla 12).

Cuando MammaPrint® clasificó como bajo riesgo, 8-gene Score coincidió en el 74% de los casos. Por el contrario, cuando MammaPrint® clasificó como alto riesgo, 8-gene Score coincidió solo en el 24% de los casos. El índice kappa es -0,02, lo cual indica que no existe acuerdo en la clasificación del riesgo entre los dos test (un valor de 1 indicaría acuerdo total) (tabla 13).

Tabla 12. Concordancia entre MammaPrint® y 8-gene Score

		8-gene Score		Total
		Bajo riesgo	Alto riesgo	
Ma- mmaPrint®	Bajo riesgo	49 (74%)	17 (26%)	66
	Alto riesgo	42 (76%)	13 (24%)	55
Total		91	30	121

Grado de acuerdo	Índice kappa
51,24%	-0,022

Tabla 13. Valoración del índice kappa (criterio de Landis y Koch)

Kappa	Grado de acuerdo
< 0,00	sin acuerdo
> 0,00-0,20	insignificante
0,21-0,40	discreto
> 0,41-0,60	moderado
0,61-0,80	sustancial
0,81-1,00	casi perfecto

5. ANÁLISIS DE LA CONCORDANCIA DE 8-GENE SCORE CON ONCOTYPE DX®

El grado de acuerdo entre Oncotype DX® (dicotomizado en < 25 y ≥ 25) y 8-gene Score es del 78% (tabla 14). Es decir, en el 78% de los casos coinciden ambos test ((73+5)/100). Cuando el Oncotype DX® clasificó como bajo riesgo, el 8-gene Score coincidió en el 85% de los casos, mientras que cuando el Oncotype DX® clasificó como alto riesgo, el 8-gene Score solo coincidió en el 36%.

Como sucedía con MammaPrint®, el grado de acuerdo es mayor para categorizar los pacientes de bajo riesgo, pero aun así el índice kappa es de 0,184, es decir, no existe concordancia ($k < 0,20$).

Tabla 14. Concordancia entre Oncotype DX® (dicotomizado en 25) y 8-gene Score

		8-gene Score		Total
		Bajo riesgo	Alto riesgo	
Oncotype DX®	Bajo riesgo	73 (85%)	13 (15%)	86
	Alto riesgo	9 (64%)	5 (36%)	14
	Total	82	18	100

Grado de acuerdo	Índice kappa
78%	0,184

La tabla 15 presenta los datos de concordancia cuando se deja el grupo de riesgo intermedio de Oncotype DX®. No es posible calcular el índice kappa en este caso porque 8-gene Score solo tiene dos categorías.

Tabla 15. Concordancia entre Oncotype DX® y 8-gene Score

	8-gene Score		Total
	Bajo riesgo	Alto riesgo	
Bajo riesgo < 18	48 (94%)	3 (6%)	51
Intermedio riesgo 18-30	31 (67%)	15 (33%)	46
Alto riesgo > 30	3 (100%)	0	3
Total	82	18	100

6. ANÁLISIS DE LA CONCORDANCIA DE LOS DATOS PRONÓSTICOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS CLÁSICOS (T2, N1MIC, RP, GRADO III, ILV Y KI67% > 20%) Y LOS PERFILES GÉNICOS: ONCOTYPE DX®, MAMMAPRINT® Y 8-GENE SCORE

En las últimas décadas, las pautas del tratamiento adyuvante en el CM se han basado en las características tumorales o biomarcadores, también llamados factores pronósticos y predictivos del CM. Los factores pronósticos clásicos que entrañan peor pronóstico son el tamaño tumoral y la afectación ganglionar, aunque en las últimas décadas se ha comenzado a prestar atención a otros como el grado histológico, Ki67 > 20%¹³⁸, invasión linfovascular¹³⁹, ausencia de receptores hormonales¹⁴⁰ y sobreexpresión de HER2¹⁴¹.

Con todos estos argumentos, se seleccionaron en nuestra serie los factores anatómo-patológicos clínicos de peor pronóstico: tamaño T2, N1, invasión linfovascular, RP negativos, grado III y Ki67 > 20% y se asociaron con los resultados de los test génicos para averiguar si algún dato

clínico identifica a las pacientes de alto riesgo en las que no estuviera indicada la realización del test genómico.

En el análisis univariante, los factores pronósticos clínico-patológicos T, N e ILV no aparecieron asociados con la clasificación del riesgo de ninguno de los test (tabla 16).

Tabla 16. Análisis univariante asociación de factores pronóstico con el riesgo según los test de clasificación

Variable	Resultado MammaPrint®			Resultado Oncotype DX®			Resultado 8-gene Score		
	Bajo riesgo (n = 66)	Alto riesgo (n = 55)	p-valor*	Bajo riesgo (n = 86)	Alto riesgo (n = 14)	p-valor*	Bajo riesgo (n = 173)	Alto riesgo (n = 48)	p-valor*
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
T									
2	12 (18,5)	14 (26,4)	0,300	14 (16,3)	1 (7,1)	0,375	31 (18,1)	10 (21,3)	0,625
N									
1	10 (15,6)	13 (24,1)	0,248	19 (22,1)	5 (35,7)	0,268	38 (22,2)	9 (19,1)	0,650
Grado									
III	6 (9,1)	20 (36,4)	< 0,001	4 (4,7)	1 (7,1)	0,692	24 (14,0)	7 (14,6)	0,900
Ki67									
Positivo ≥20%	11 (17,2)	33 (61,1)	< 0,001	39 (45,4)	11 (78,6)	0,021	77 (45,0)	17 (36,2)	0,277
ILV									
Sí	6 (10,3)	8 (15,1)	0,452	-	-	-	11 (13,3)	3 (10,7)	0,726
RP									
Negativa	10 (15,2)	9 (16,4)	0,855	4 (4,7)	4 (28,6)	0,002	22 (12,7)	5 (10,4)	0,667
Positiva	56 (84,8)	46 (83,6)		82 (95,3)	10 (71,4)		151 (87,3)	43 (89,6)	
RP positiva									
Positiva <20%	7 (12,7)	4 (8,7)	0,517	9 (11,0)	3 (30,0)	0,092	16 (10,6)	7 (16,7)	0,283
Positiva ≥20%	48 (87,3)	42 (91,3)		73 (89,0)	7 (70,0)		135 (89,4)	35 (83,3)	

*Test Chi-cuadrado.

El grado III está asociado a alto riesgo en el test MammaPrint®. El 9% de los pacientes que fueron clasificados como bajo riesgo según MammaPrint® tenían grado III, mientras que entre las pacientes clasificadas como de alto riesgo, el 36% tenían grado III. Para los test Oncotype DX® y 8-Gene no existe asociación.

El Ki67 se asocia a alto riesgo en los test MammaPrint® y Oncotype DX®. En el MammaPrint® el 61% de las pacientes con alto riesgo tenían un Ki67 positivo > 20%, mientras que las pacientes con bajo riesgo, tan solo el 17%. En el Oncotype DX®, de los pacientes clasificados con

alto riesgo, el 79% tenían Ki67 > 20% y de los clasificados en bajo riesgo, el 45%. El Ki67 no se asocia con el resultado del test 8-gene Score.

Los RP negativos se asociaron a alto riesgo en el test Oncotype DX®. El 28,6% de las pacientes de alto riesgo tenían RP negativos, frente a tan solo el 4,7% de las de bajo riesgo. Para los test MammaPrint® y 8-gene Score no existe asociación. Estableciendo un punto de corte del 20% para la positividad de los RP, se analizó si había asociación entre el porcentaje de positividad y la clasificación de riesgo. No se ha encontrado asociación estadísticamente significativa con ningún test, pero se observa que tanto en el Oncotype DX® como en el 8 gene-Score hay mayor porcentaje de pacientes clasificados en alto riesgo cuando el RP es < 20%.

7. CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RE, RP Y HER2 MEDIANTE IHQ Y EXPRESIÓN GÉNICA DE MAMMAPRINT® Y ONCOTYPE DX®

7.1 Correlación de la expresión de RE, RP y HER2 mediante IHQ y expresión génica de MammaPrint®

1. El grado de acuerdo para los resultados de RE fue del 100%. Todas las pacientes tenían RE positivo tanto en IHQ como en la expresión génica de MammaPrint®.
2. En el caso de la expresión de RP, la concordancia fue un poco inferior, como muestra la tabla 17. MammaPrint® dio como positivos el 95% de los detectados como positivos por IHQ, pero también un 37% de los que la IHQ dio como negativos.

El grado de acuerdo fue del 90,08% con un índice kappa de 0,61.

Tabla 17. Concordancia RP resultados anatomo-clínicos vs. MammaPrint®

		MammaPrint®		
		RP negativo	RP positivo	Total
Anato- mo-clí- nicos	RP negativo	12 (63%)	7 (37%)	19
	RP positivo	5 (5%)	97 (95%)	102
Total		17 (14,1%)	104 (85,9%)	121

Grado de acuerdo	Índice kappa
90,08%	0,61

1. La concordancia de HER2 fue muy alta (tabla 18), en el 97,5% fueron en ambos negativos. Tan solo en tres pacientes (2,5%) se obtuvo un resultado positivo mediante la expresión de génica MammaPrint® con negatividad para IHQ.

Tabla 18. Concordancia HER2 resultados anatomo-clínicos vs. MammaPrint®

		MammaPrint®		
		Negativo	Positivo	Total
Ana- tomo- clínicos HER2	HER2 Negativo	118 (97,5%)	3 (2,5%)	121
	HER2 Positivo	0	0	0
Total		118	3	121

Grado de acuerdo	Índice kappa
97,52%	-

7.2 Correlación de la expresión de RE, RP y HER2 mediante IHQ y expresión génica de Oncotype DX®

1. El grado de acuerdo para los resultados de RE fue del 100%. Todas las pacientes tenían RE positivo tanto en IHQ como en la expresión génica de Oncotype DX®.

2. En el caso de la expresión de RP, la concordancia fue del 92%. Hubo ocho casos positivos por expresión génica y negativos mediante IHQ (tabla 19).

Tabla 19. Concordancia RP resultados anatomo-clínicos vs. Oncotype DX®

		Oncotype DX®		Total
		Negativo	Positivo	
Anatomo-clínicos RP	RP Negativo	0	8 (100%)	8
	RP Positivo	0	92 (100%)	92
Total		0	100	100

Grado de acuerdo	Índice kappa
92,00%	-

3. El grado de acuerdo en cuanto a los resultados de HER2 fue del 100%. Todas las pacientes tenían HER2 negativo.

8. PORCENTAJE DEL CAMBIO DE LA DECISIÓN DE LA ACTITUD TERAPÉUTICA ENTRE LOS FACTORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS CLÁSICOS Y MAMMAPRINT® Y ONCOTYPE DX®

8.1 Análisis global

Antes de conocer el resultado del test genómico y con base en los factores clínico-patológicos clásicos, de los 221 casos, los oncólogos recomendaron un tratamiento combinado de QT-HT a 101 pacientes (45,7%) y HT exclusiva a las 120 pacientes restantes (54,3%), según muestra la tabla 20 y la figura 11.

Tabla 20. Decisión terapéutica previa a la realización del test

	Quimioterapia	Hormona
Decisión terapéutica	101 (45,7%)	120 (54,3%)

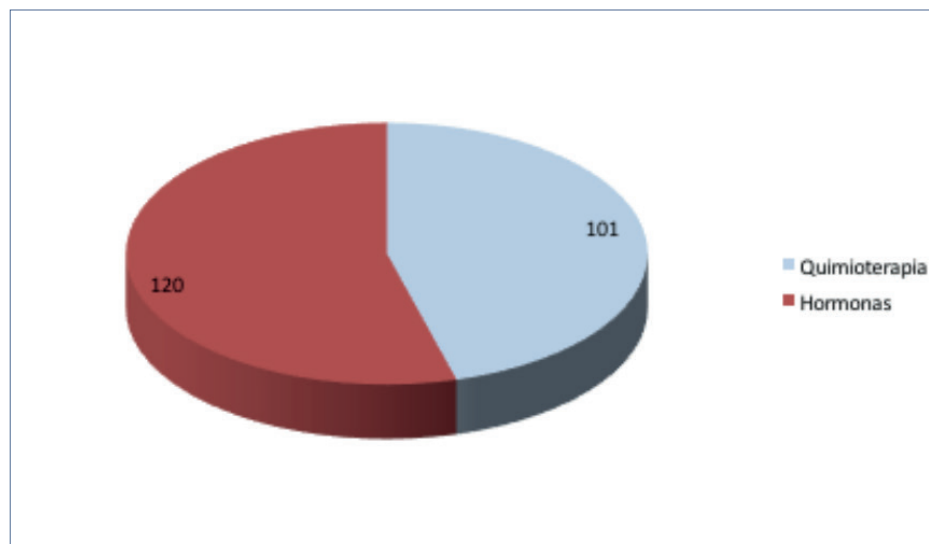


Figura 11. Decisión global terapéutica previa a la realización del test.

Tras la realización del MammaPrint® (HRyC y HULP) y el Oncotype DX® (HBAS) se cambió la decisión terapéutica en 70 pacientes (32%) (fig. 12). De estos 70 cambios, en 19 casos no estaba prevista la QT y se decidió administrar, y en 51 casos estaba prevista la QT y se decidió evitar y administrar solo hormonas (tabla 21 y figs. 12 y 13).

Tabla 21. Cambio de decisión global según terapia prevista

		Cambio decisión		Decisión inicial	Decisión final
		No	Sí		
Decisión terapéutica	Hormonas	101 (84%)	19 (16%)	120 (54%)	152 (68%)
	Quimioterapia	50 (50%)	51 (50%)	101 (46%)	69 (32%)
	Total	151 (68%)	70 (32%)	221	221

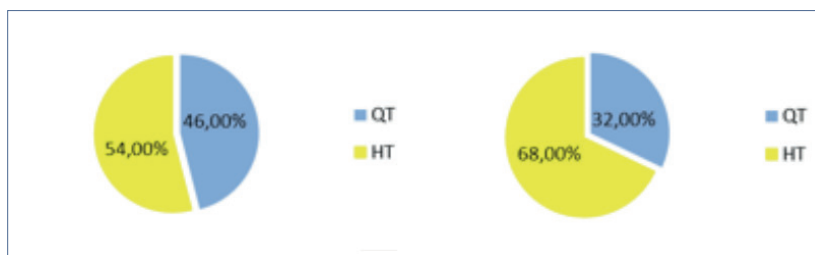


Figura 12. Decisión de tratamiento previsto y decisión final tras perfil genómico.

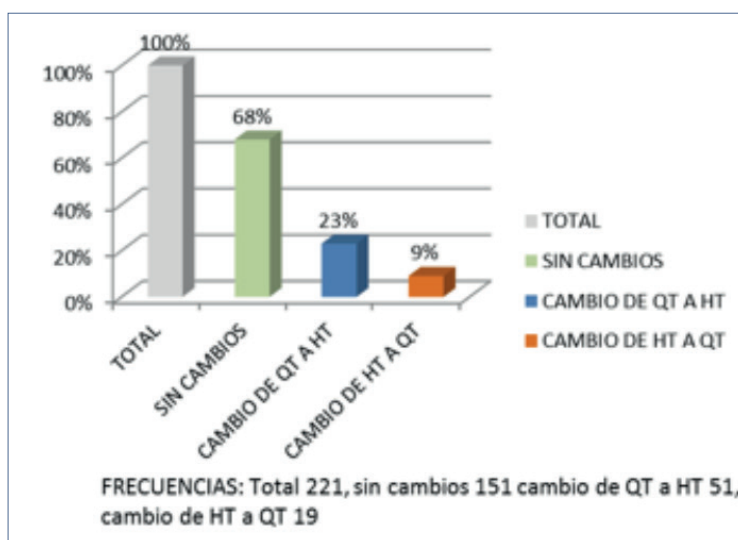


Figura 13. Cambio de decisión global según terapia prevista.

8.2 Análisis del grupo de pacientes a las que se solicitó Oncotype DX®

Antes de conocer el valor del RS los oncólogos médicos recomendaron QT-HT a 27 de las 100 pacientes con Oncotype DX® y HT a las 73 pacientes restantes (tabla 22 y fig. 14).

Tabla 22. Cambio de decisión según terapia prevista y test OncoType DX®

		Cambio decisión		Decisión inicial	Decisión final
		Oncotype DX®			
		No	Sí		
Decisión terapéutica	Hormona	72 (85%)	1 (7%)	73 (73%)	86 (86%)
	Quimioterapia	13 (15%)	14 (93%)	27 (27%)	14 (14%)
	Total	85 (85%)	15 (15%)	100	100

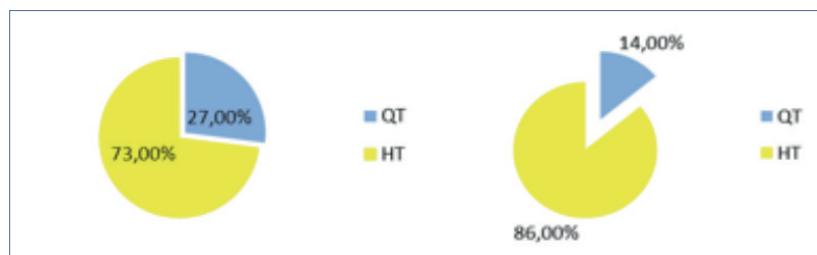


Figura 14. Decisión de tratamiento previsto y decisión final tras Oncotype DX®.

De las 85 pacientes en las que no se cambió la decisión, en 72 se había resuelto inicialmente HT, y en 13, QT-HT. De las 73 pacientes que en un principio iban a recibir hormonas, una acabó percibiendo también QT, mientras que de las 27 que iban a recibir QT-HT, 14 finalmente solo tuvieron hormona (fig. 15).

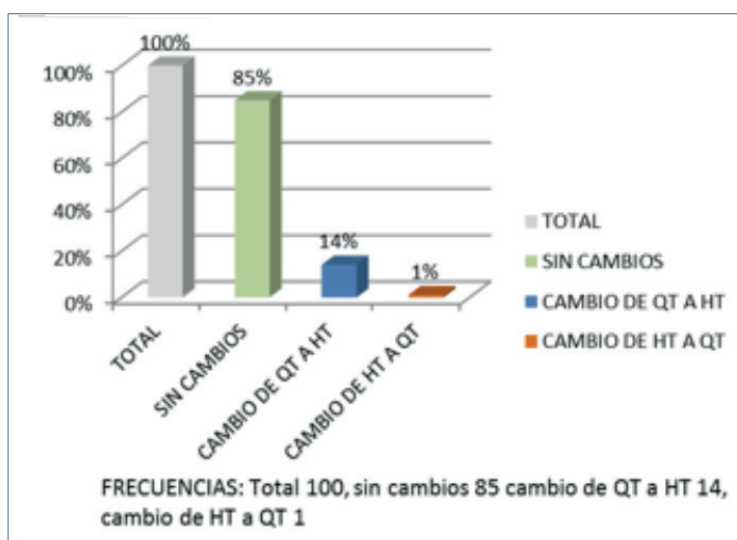


Figura 15. Cambio de decisión según terapia prevista con Oncotype DX®.

8.2.1 Análisis del grupo de pacientes Oncotype DX® de bajo riesgo

Si analizamos los cambios de decisión en función de los resultados de bajo riesgo (tabla 23), observamos que a 21 de estas 86 pacientes se les iba a administrar QT, pero en 14 casos (66,7%), tras el resultado del Oncotype DX®, se cambió la resolución, como muestra la figura 16. Por tanto, hubo una reducción de tratamientos de QT del 25 al 8% y un aumento de la HT como tratamiento único del 75 al 92%.

Tabla 23. Cambio de decisión según terapia prevista y test Oncotype DX® < 25

		Cambio decisión		Decisión inicial	Decisión final
		Oncotype DX® < 25			
		No	Sí		
QT pre-vis-ta	NO	65 (100%)	0 (0%)	65 (75%)	79 (92%)
	SÍ	7 (33,3%)	14 (66,6%)	21 (25%)	7 (8%)
	Total	72 (83,7%)	14 (16,2%)	86	86

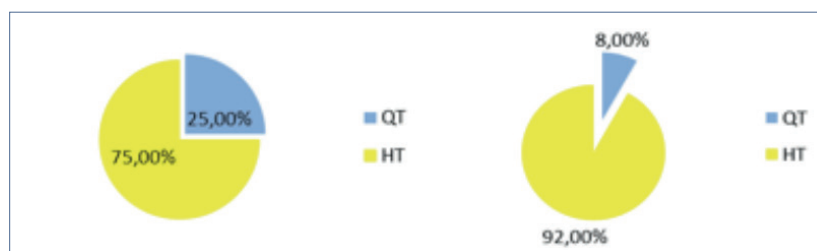


Figura 16. Decisión de tratamiento previsto y decisión final tras OncoType DX® < 25.

8.2.2 Análisis del grupo de pacientes Oncotype Dx® de alto riesgo

De las 14 pacientes de alto riesgo, a 6 se les había previsto QT. De las 8 restantes, solo se cambió la decisión en un caso (12,5%) (tabla 24 y fig. 17).

En este subgrupo de pacientes, el cambio de decisión terapéutica fue menor, con una diferencia del 7%.

Tabla 24. Cambio de decisión según terapia prevista y test Oncotype DX® > 25

		Cambio decisión		Decisión inicial	Decisión final
		Oncotype DX® > 25			
		No	Sí		
QT pre-vis-ta	NO	7 (87,5%)	1 (12,5%)	8 (57%)	7 (50%)
	SÍ	6 (100%)	0 (0%)	6 (43%)	7 (50%)
	Total	13 (92,8%)	1 (7,2%)	14	14

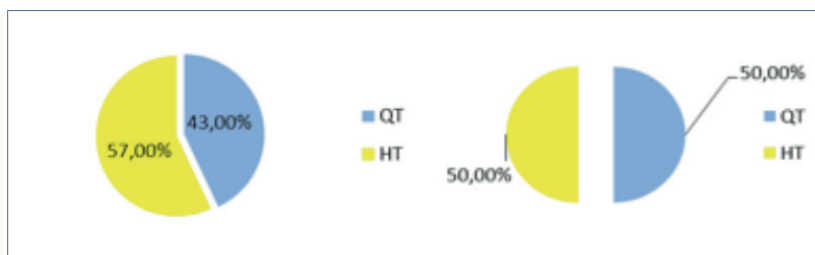


Figura 17. Decisión de tratamiento previsto y decisión final tras Oncotype DX® > 25.

8.2.3 Análisis del grupo de pacientes Oncotype Dx® global

De forma global, estas recomendaciones habrían supuesto tratar con QT-HT a 14 de las 86 pacientes del grupo de bajo riesgo (16%) y a 13 de las 14 de las de alto riesgo (93%) (fig. 18).

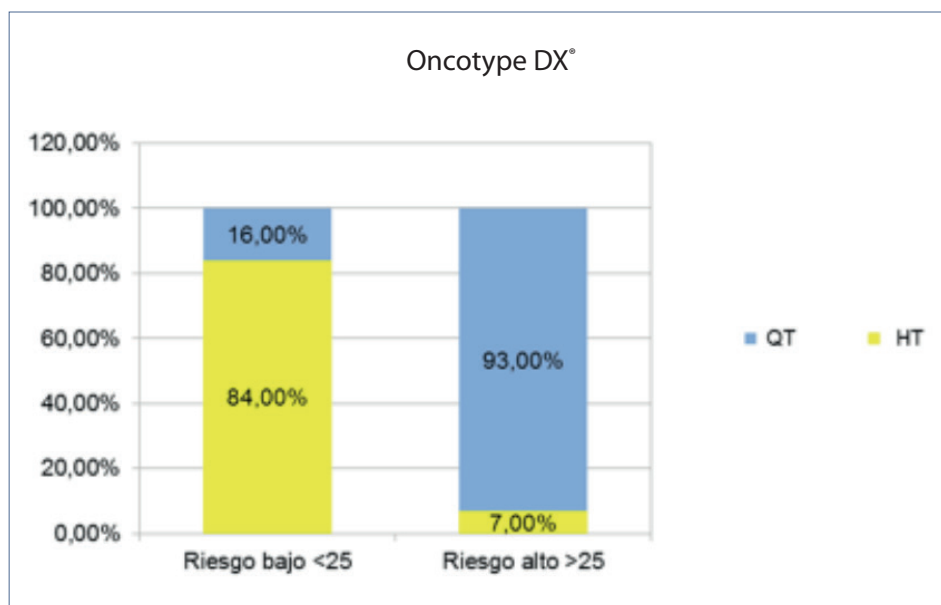


Figura 18. Decisión inicial en las pacientes a las que se realizó Oncotype DX®.

Sin embargo, tras conocer el resultado del test se pasó de QT-HT a HT sola en 14 casos y hubo uno que pasó de hormona sola al tratamiento combinado, como se mostró previamente en la figura 15.

Las recomendaciones de tratamiento indicadas tras la realización de Oncotype DX® casi resultaron coherentes con el resultado del test: se recomendó QT-HT al total de las tres (100%) pacientes del grupo de alto riesgo ≥ 31 . De las 11 pacientes de riesgo intermedio, solo a 4 (36%)

se les administró finalmente QT, todas ellas con un RS > 25. Las 7 pacientes restantes del grupo intermedio (64%) no recibieron QT, a pesar de que también el RS era > 25 (tabla 25).

Tabla 25. Recomendación de tratamiento final tras Oncotype DX® > 25

Pacientes RS > 25				
> 25	<18/18-30/≥3	RS	QT prevista	Cambio de decisión
Alto riesgo	Alto	42	Sí	No
Alto riesgo	Alto	47	Sí	No
Alto riesgo	Intermedio	30	No	No
Alto riesgo	Intermedio	27	No	No
Alto riesgo	Intermedio	27	No	No
Alto riesgo	Intermedio	27	No	No
Alto riesgo	Intermedio	27	No	No
Alto riesgo	Intermedio	31	Sí	No
Alto riesgo	Alto	33	Sí	No
Alto riesgo	Intermedio	26	Sí	No
Alto riesgo	Intermedio	30	No	No
Alto riesgo	Intermedio	26	No	No
Alto riesgo	Intermedio	25	Sí	No
Alto riesgo	Intermedio	28	No	Sí

Por otra parte, tan solo a 7 pacientes (8%) del grupo de bajo riesgo (RS < 25) se les administró QT, y una de ellas tenía un RS < 18 (tabla 26).

Tabla 26. Recomendación de QT final tras Oncotype DX® < 25

Pacientes RS < 25					
< 25	<18/18-30/≥3	RS	QT prevista	Cambio de decisión	Se dio finalmente
Bajo riesgo	Intermedio	18	Sí	No	Sí
Bajo riesgo	Intermedio	20	Sí	No	Sí
Bajo riesgo	Bajo	14	Sí	No	Sí
Bajo riesgo	Intermedio	24	Sí	No	Sí
Bajo riesgo	Intermedio	24	Sí	No	Sí
Bajo riesgo	Intermedio	24	Sí	No	Sí
Bajo riesgo	Intermedio	23	Sí	No	Sí

La HT se recomendó a 79 pacientes (92%) del grupo de bajo riesgo y a 7 (50%) de las pacientes del grupo de alto riesgo con RS ≥ 25. Estas 7 pacientes eran del grupo intermedio y ninguna tenía RS ≥ 31 (fig. 19).

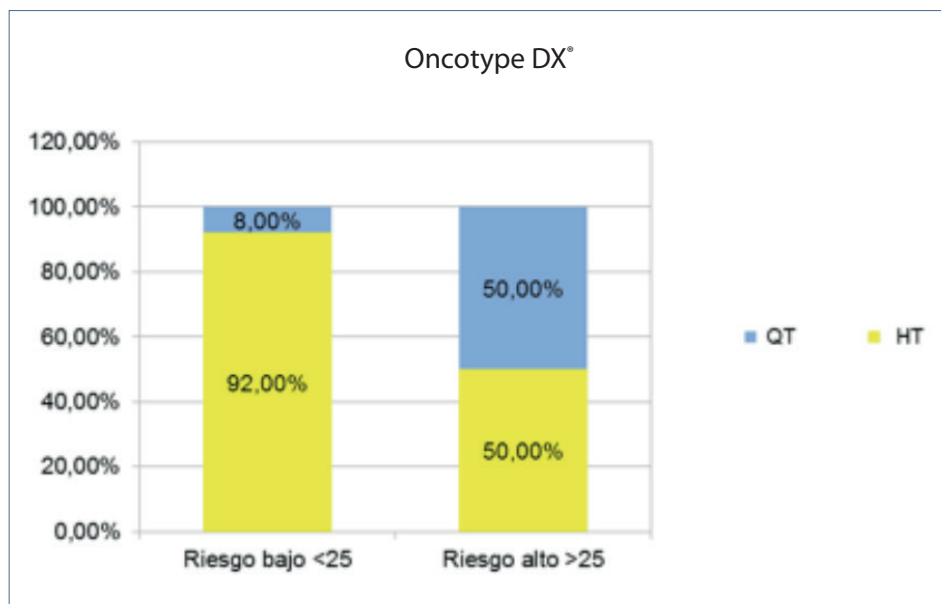


Figura 19. Tratamientos pautados definitivamente, en función de resultados de Oncotype DX® y variables clínicas.

8.3 Análisis del grupo de pacientes a las que se solicitó MammaPrint®

Tras conocer el resultado de MammaPrint®, la decisión de tratamiento se modificó en 55 (45%) de las 121 pacientes. De los 55 cambios de decisión, en 37 enfermas (67%) este fue de QT-HT a HT sola, y en las 18 enfermas (33%) restantes, lo contrario (tabla 27 y figs. 20 y 21).

Hubo 66 pacientes (55%) en las cuales no hubo cambios: 29 (44%) recibieron HT y 37 (56%) también QT (tabla 27).

Tabla 27. Cambio de decisión según terapia prevista y test MammaPrint®

		Cambio decisión		Decisión inicial	Decisión final
		MammaPrint®			
		No	Sí		
Decisión terapéutica	Hormona	29 (44%)	18 (33%)	47 (39%)	66 (55%)
	Quimioterapia	37 (56%)	37 (67%)	74 (61%)	55 (45%)
	Total	66 (55%)	55 (45%)	121	121

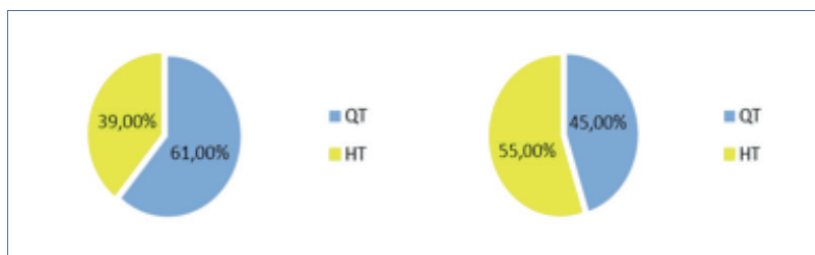


Figura 20. Decisión de tratamiento previsto y decisión final tras MammaPrint®.

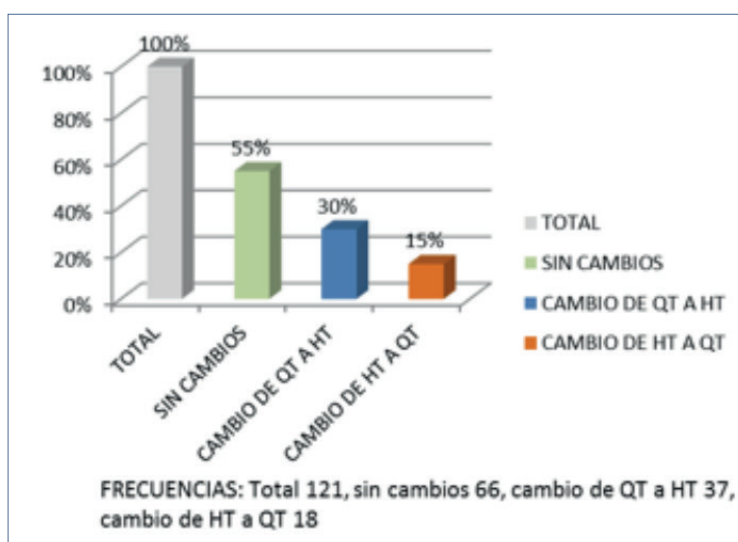


Figura 21. Cambio de decisión según terapia prevista con MammaPrint®.

8.3.1 Análisis del grupo de pacientes MammaPrint® de bajo riesgo

En el caso de las 66 pacientes clasificadas por MammaPrint® como bajo riesgo, hubo 28 a las que se les había previsto QT. Tras el resultado del MammaPrint® se cambió la decisión en 26 casos (92,9%). Además, de las 38 pacientes en las que no estaba prevista QT, hubo 9 pacientes (23,7%) en las que se cambió la decisión y se administró QT a pesar del resultado del test genómico (tabla 28).

Hubo un cambio de decisión terapéutica en el sentido de que la HT sola subió del 58 al 83% y la QT se redujo del 42 al 17% (fig. 22).

Tabla 28. Cambio de decisión según terapia prevista y test MammaPrint® de bajo riesgo

		Cambio decisión		Decisión inicial	Decisión final
		MammaPrint® de bajo riesgo			
		No	Sí		
QT previs- ta	NO	29 (76,3%)	9 (23,7%)	38 (58%)	55 (83%)
	SÍ	2 (7,1%)	26 (92,9%)	28 (42%)	11 (17%)
	Total	31 (46,9%)	35 (53,1%)	66	66

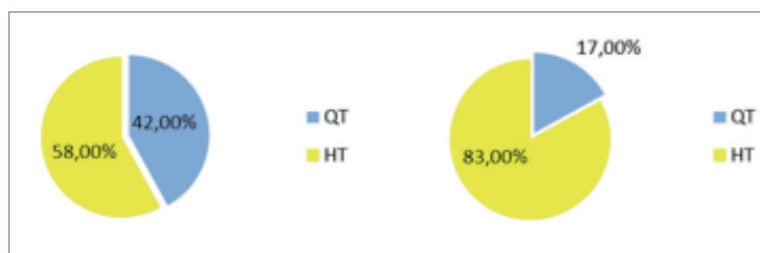


Figura 22. Cambio de decisión en MammaPrint® de bajo riesgo.

8.3.2 Análisis del grupo de pacientes MammaPrint® de alto riesgo

Hubo 55 pacientes de alto riesgo por MammaPrint®. De estas, a 46 se les había previsto QT. En el caso de las 9 restantes (100%), se cambió la decisión (tabla 29).

Tabla 29. Cambio de decisión según terapia prevista y test MammaPrint® de alto riesgo

		Cambio decisión			
		MammaPrint® de alto riesgo			
		No	Sí	Decisión inicial	Decisión final
QT pre- vista	NO	0 (0%)	9 (100%)	9 (16%)	11 (20%)
	SÍ	35 (76,1%)	11 (23,9%)	46 (84%)	44 (80%)
	Total	35 (66,6%)	20 (36,4%)	55	55

Al igual que ocurrió en las pacientes de Oncotype DX® de alto riesgo, el cambio de decisión terapéutica en el grupo de MammaPrint® de alto riesgo fue menor, habiendo una reducción en el uso de QT de tan solo un 4% (fig. 23).

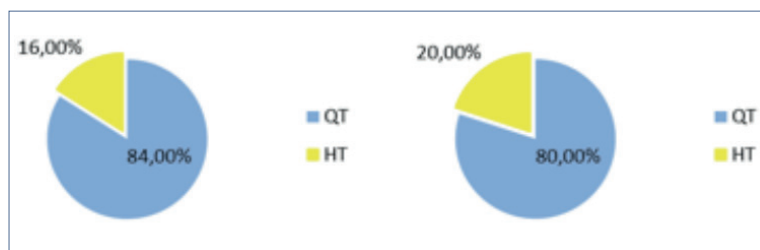


Figura 23. Cambio de decisión en MammaPrint® de alto riesgo.

8.3.3 Análisis del grupo de pacientes MammaPrint® global

Las variaciones más importantes acaecidas tuvieron lugar en el grupo de bajo riesgo, ya que en 35 de las 66 pacientes (53,1%) se modificó la decisión. En el grupo de alto riesgo se cambió la recomendación de tratamiento a 20 de las pacientes (36,4 %), sugiriendo QT-HT a aquellas que se había previsto HT sola (9 pacientes). Sin embargo, 11 pacientes de alto riesgo finalmente solo recibieron hormona.

En la figura 24 se muestra el cambio de decisión teniendo en cuenta la indicación previa con los datos anatomo-patológicos clásicos y la decisión del oncólogo, desglosados por grupos de riesgo.

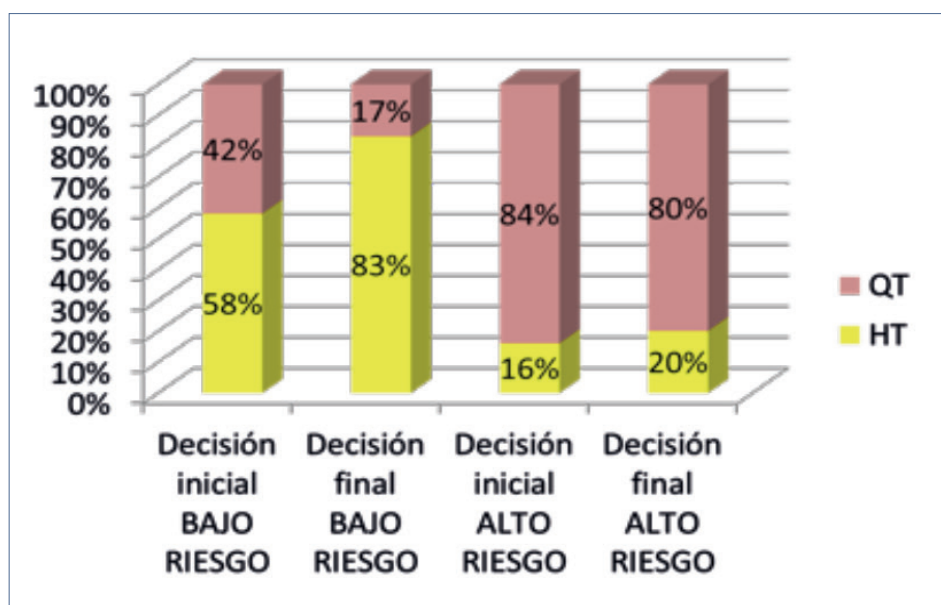


Figura 24. Decisión inicial y final en MammaPrint® desglosada en bajo y alto riesgo.

9. PORCENTAJE DEL CAMBIO DE LA DECISIÓN DE LA ACTITUD TERAPÉUTICA CON 8-GENE SCORE RESPECTO AL RESTO DE PLATAFORMAS

Al disponer de la intención terapéutica previa al test genómico, se decidió estimar el porcentaje de cambio de decisión que se asociaría al empleo del 8-gene Score y dando por supuesto que en todos los casos se seguiría la recomendación indicada por el resultado de esta prueba (tabla 30 y fig. 25).

Con esta premisa, se produjo un cambio de decisión en 113 pacientes (51%). En 30 casos (25%), se pasó de hormona sola a QT-HT, y en 83 pacientes (82%), se evitó la QT (fig. 26).

Esta variación en la decisión es superior a la de MammaPrint® (HRyC y HULP) y Oncotype DX® (HBAS), que modificaron su decisión terapéutica en 70 pacientes (32%). De estas 70, en 19 casos (16%) no estaba prevista la QT y se decidió administrar, y en 51 casos (50%) en que sí estaba prevista, finalmente se evitó.

En el caso de haber aplicado 8-gene Score, la reducción del tratamiento de QT hubiera sido mayor (38 vs. 23%) con el incremento del paso de HT a QT-HT (13 vs. 9%) (fig. 26, en comparación con fig. 14).

Tabla 30. Cambio de decisión según terapia prevista y test 8-gene Score

		Cambio decisión 8-gene Score		Decisión inicial	Decisión final
		No	Sí		
Decisión terapéutica	Hormonas	90 (75%)	30 (25%)	120 (54%)	173 (78%)
	Quimioterapia	18 (18%)	83 (82%)	101 (46%)	48 (22%)
	Total	108 (49%)	113 (51%)	221	221

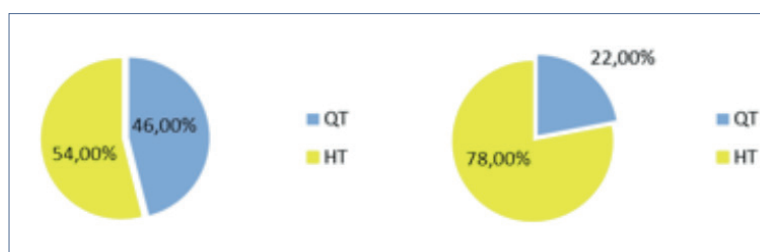


Figura 25. Decisión de tratamiento previsto y decisión final tras 8 gene-Score.

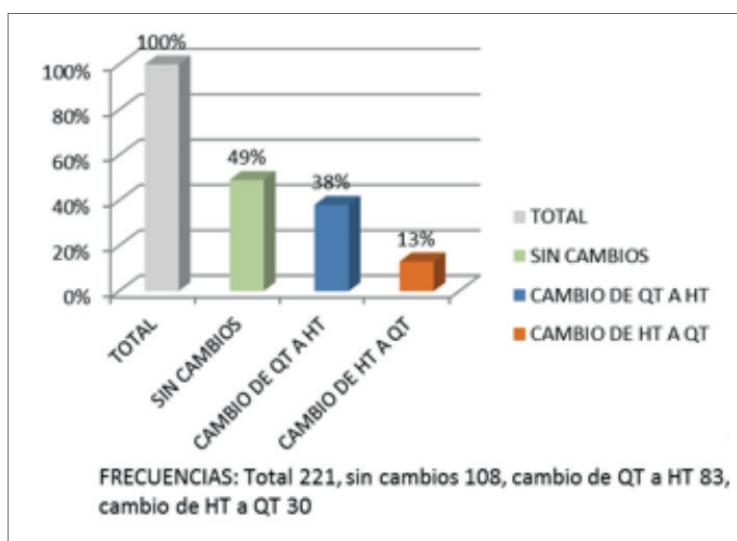


Figura 26. Cambio de decisión según terapia prevista con 8-gene Score.

Tesis doctoral

DISCUSIÓN

El CM es una enfermedad heterogénea, que agrupa pacientes con pronósticos muy diferenciados desde el momento de su diagnóstico. Siguen vigentes los factores pronósticos clínicos y patológicos clásicos para decidir el tratamiento complementario a la cirugía, pero su utilidad es limitada. Los perfiles de expresión génica han venido a complementar la información proporcionada por los factores clásicos para identificar mejor a las pacientes subsidiarias de un tratamiento quimioterápico adyuvante.

En este trabajo hemos analizado la concordancia de los dos principales perfiles génicos publicados, MammaPrint® y Oncotype DX®, con un perfil desarrollado por el grupo de investigación del HULP, 8-gene Score. Dado que los trabajos previamente publicados sobre comparación entre plataformas han comunicado tasas elevadas de discordancia, planteamos la hipótesis de que la concordancia aumentaría seleccionando una población uniforme de pacientes y empleando siempre el mismo tipo de muestra.

La hipótesis de trabajo no se pudo confirmar. Durante la discusión se analizarán las posibles causas de la falta de concordancia, revisando las características de los perfiles génicos estudiados para discutir los resultados obtenidos.

1. ANÁLISIS DE CONCORDANCIA

El objetivo inicial de esta investigación que fue el estudio de concordancia entre el 8-gene Score y otros test moleculares comerciales ha sido negativo. El grado de acuerdo con MammaPrint® fue del 51% y con Oncotype DX® (dicotomizado en < 25 y ≥ 25) del 78%, pero ambos con un índice kappa de -0.02, lo cual indica que no existe acuerdo en la clasificación. En los siguientes apartados iremos analizando las posibles causas de ello.

1.1 Población de estudio

A la hora de diseñar este trabajo, se decidió incluir retrospectivamente a pacientes con CM precoz estadio I o II según la clasificación TNM del año 2002, con RE y/o RP positivos y HER2 negativo. En todos los casos se había solicitado un perfil génico dentro de la práctica habitual de cada centro y se cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión.

Cabe destacar que la población de pacientes a la que van enfocados estos test es distinta. Oncotype DX® está destinado para su uso en mujeres diagnosticadas de CM estadio I/II, HER2 negativo, con RE positivos y sin invasión ganglionar o con 1 a 3 ganglios positivos^{87,88,90,142,143}. MammaPrint®, por su parte, está aprobado para su utilización en mujeres con CM de tamaño < 5 cm, estadio I/II, con HER2 y RE tanto positivos como negativos y sin invasión ganglionar^{80,81,84,85,123,144,145}. Las características clínicas de todas las pacientes incluidas en nuestra serie se ajustan más a las del test genómico Oncotype DX®, si tenemos en cuenta que la recomendación actual de tratamiento adyuvante en pacientes con tumores HER2+ o con RE- es la QT.

La solicitud de las plataformas no solo se ajusta a las guías nacionales e internacionales^{8,146-148}, sino a la práctica asistencial en el territorio español, por lo que podemos asegurar que nuestra población es homogénea, adecuada y ceñida a la indicación prevista, a diferencia de otros estudios. Por tanto, descartamos que esta fuera la causa de la discordancia.

1.2 Diferencias entre los test genómicos Oncotype DX®, MammaPrint® y 8-gene Score: tipo y número de genes de estudio y técnica utilizada

Las plataformas genómicas Oncotype DX® y MammaPrint® han sido diseñadas con un mismo objetivo: estimar el riesgo de recaída a distancia del CM inicial en estadio precoz. Aun así, existen algunas diferencias.

En lo referente a la técnica, Oncotype DX® analiza la expresión de 21 genes (16 genes relacionados con el cáncer y 5 de referencia) mediante la tecnología RT-PCR. MammaPrint® analiza la expresión de 70 genes relacionados con el cáncer mediante *microarrays*. Ambas pruebas solo tienen en común la expresión de un gen (SCUBE2) como muestra la figura 27¹⁴⁹. Aunque esto pueda parecer sorprendente, se ha señalado que las distintas plataformas terminan analizando un gran número de variables altamente correlacionadas, es decir, atienden en las mismas vías y procesos biológicos¹⁰. La selección de distintas combinaciones de estas variables puede utilizarse para elaborar modelos de predicción muy similares.

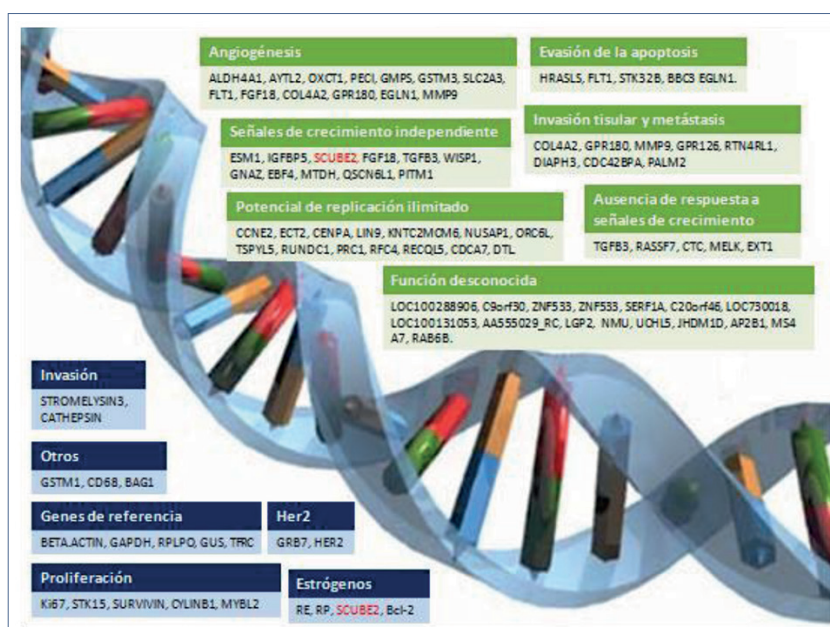


Figura 27. Genes analizados por el test genómico Oncotype DX® (en azul) y MammaPrint® (en verde). En rojo, el gen SCUBE2 común a ambas plataformas genómicas.

En cuanto a las muestras necesarias para el análisis genético, Oncotype DX[®] utilizó tejido FFPE, mientras que MammaPrint[®] fue inicialmente validado para muestras de tejido tumoral en fresco. Las limitaciones que en la práctica clínica habitual conlleva la necesidad de disponer de tejido tumoral fresco han conducido al desarrollo del test genómico MammaPrint[®] en FFPE. Un estudio llevado a cabo por científicos de la universidad de Turín demostró que MammaPrint[®]-FFPE tiene un desempeño muy similar a MammaPrint[®]-Fresh con una precisión del 97,3% y una reproducibilidad del 97,8%¹³⁷.

En lo referente a la cantidad de muestra necesaria para la realización del test genómico, Oncotype DX[®] precisa de entre 35 a 65 μ m de tejido tumoral, mientras que para la realización de MammaPrint[®] la muestra debe contener al menos un 30% de células tumorales infiltrantes.

El 8-gene Score analiza la expresión génica por RT-qPCR sobre tejido FFPE, donde analiza tan solo ocho genes, de los cuales están todos presentes en el perfil genómico de MammaPrint[®] y solo uno de ellos (SCUBE2) coincide con Oncotype DX[®]. Este perfil demostró su capacidad pronóstica mediante una validación interna, así como una validación externa (en cuatro bases de datos independientes). Además, se ha comparado la capacidad predictiva del perfil de 8 genes con varios perfiles comerciales¹⁰¹⁻¹⁰³.

En nuestro estudio, 8-gene Score se determinó sobre la misma muestra de parafina donde se había realizado el test génico comercializado, por lo cual eliminamos la posible variabilidad intratumoral y la heterogeneidad neoplásica.

En cuanto al tipo de genes, MammaPrint[®] contiene no solo los genes de 8-gene Score, sino muchos más, alguno de los cuales podría ser crítico para determinar el pronóstico. Pero en tal caso es poco probable que 8-gene Score hubiera superado el proceso de validación interna, como después expondremos más explícitamente¹⁰¹⁻¹⁰³. De todas maneras, y como ya se ha señalado, las diferencias en los genes incluidos no bastan para deducir que un perfil sea superior a otro.

MammaPrint® y el Oncotype DX® coinciden en un único gen y ambos han demostrado de forma sobrada su capacidad pronóstica de forma independiente. La razón estriba en que cada sonda genética específica tiene diferentes rendimientos en las diversas plataformas de ensayo y, por lo tanto, un gen que se desempeña bien en el formato de *microarrays* puede no funcionar bien en un formato RT-PCR, y viceversa. Dado que muchos genes son pronósticos, en el algoritmo final de cada plataforma se incluyen solo los que tienen mayor capacidad predictiva cuando trabajan juntos, es decir, formando parte de un perfil. Un trabajo ya clásico demostraba que, siempre que se dispusiera del número suficiente de genes, podían llegar a elaborarse modelos pronósticos similares con diferentes genes¹⁵⁰.

Las técnicas utilizadas son comunes para el test 8 gene-Score y Oncotype®, basado en la técnica de PCR. MammaPrint® usa la tecnología de *microarrays*, perfectamente validada, por lo que esta diferencia tecnológica tampoco justifica la falta de acuerdo.

1.3. Revisión de validación de los diferentes test génicos

1.3.1 Oncotype DX®

El primer estudio de validación clínica del test genómico Oncotype DX® fue retrospectivo e incluyó a 668 mujeres con CM con ganglios negativos y RE positivos, tratadas con tamoxifeno en el ensayo clínico B-14 del *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*. Se demostró que el porcentaje de pacientes libres de recurrencia a distancia a los diez años de la cirugía era superior en el grupo de bajo riesgo establecido por Oncotype DX®, como se muestra en la tabla 31⁸⁷.

Tabla 31. Tabla de recurrencia a distancia según RS en estudio de validación Oncotype DX®⁸⁷

Categoría del riesgo	% Pacientes	Tasa de recurrencia 10 años
< 18	51	6,8 (4,0-9,6)
18-30	22	4,3 (8,3-20,3)
≥ 31	27	30,5 (23,6-37,4)

Existen diferencias respecto a nuestro trabajo. Si bien en ambos casos el 51% de las pacientes tenían bajo riesgo, en el estudio de validación el grupo de alto riesgo supuso un 27%, frente a solo un 3% en nuestra serie (el resto de las enfermas pertenecen al grupo de riesgo intermedio). Por otra parte, en el estudio de validación un 62% de los tumores tenía un tamaño ≤ 2 cm, frente a un 85% en nuestra investigación. Esto último probablemente refleje la tendencia actual de diagnóstico del CM en estadios cada vez más precoces gracias al éxito de los programas de cribado. Además, el hecho de que la mayoría de los tumores analizados se correspondan con un estadio pT1 está en consonancia con la idea de que debido a la heterogeneidad del CM, el riesgo de recaída de tumores de pequeño tamaño no debe despreciarse¹⁵¹.

El único estudio prospectivo de la plataforma Oncotype DX® es el ensayo fase III TAILORx⁹¹. Este incluye a pacientes con CM HER2 negativo con receptores hormonales positivos y sin afectación de los ganglios axilares, tratadas de manera uniforme, y pretende identificar a pacientes en las que se puede prescindir de manera segura de la QT adyuvante. Solo se han comunicado los resultados en el caso del grupo de riesgo bajo: el 99% de las mujeres con resultados bajos de Oncotype DX® Recurrence Score® se encuentran sin recidiva del CM tras cinco años de recibir únicamente terapia hormonal. Para minimizar el riesgo de infratratamiento, los investigadores modificaron los puntos de corte originales, de modo que el grupo de bajo riesgo quedaba definido por un RS ≤ 10 (< 18 en la definición original), el intermedio por RS 11-24 (18-30 originalmente) y el alto por RS ≥ 25 (≥ 31) 14.

Si adaptamos estos puntos de corte a nuestra serie, encontramos que en el EC TAILORx los porcentajes de riesgo bajo, intermedio y alto eran de 34, 59 y 7%, respectivamente, frente a 22, 64 y 14% en nuestra serie. Otra diferencia es que en el ensayo TAILORx no se admitían pacientes con ganglios positivos, que suponían el 24% de nuestras pacientes.

1.3.2 MammaPrint®

El estudio de validación clínica del test genómico MammaPrint® se realizó en una muestra retrospectiva de 295 mujeres con edad ≤ 53 años, tumores de < 5 cm con RE y ganglios tanto positivos (48%) como negativos (42%) y tratadas de manera heterogénea⁸⁰. La tabla 32 muestra las tasas de recaída por grupo de riesgo.

Tabla 32. Tabla de recurrencia a distancia según RS en estudio de validación MammaPrint®⁸⁰

MammaPrint®		
MammaPrint®	Pacientes	Tasa de recurrencia 10 años
Bajo riesgo	180	94,5 \pm 28%
Alto riesgo	115	54,6 \pm 44%

Se trata, por tanto, de una población muy distinta a la nuestra. Sí coinciden en que los tumores tenían un tamaño < 5 cm y, aunque la mayoría de las enfermas no presentaba afectación ganglionar al diagnóstico, se hallaron micrometástasis en el 19% de los casos. Nuestra muestra incluye a mujeres diagnosticadas de carcinoma ductal infiltrante de mama, estadios I-II, con receptores hormonales positivos y que han recibido un tratamiento adecuado para la enfermedad neoplásica. El rango de edad osciló entre 33 y 73 años, con una mediana de 57 años, que coincide con la mediana de edad de diagnóstico del CM en la población general.

También existen diferencias importantes en lo referente al tratamiento adyuvante administrado. Mientras que en el estudio holandés únicamente un 3% de las pacientes sin afectación ganglionar recibieron QT, en nuestro trabajo lo hicieron un 40%. Así mismo, en el estudio holandés, de entre todas las pacientes con receptores hormonales positivos, solo un 17% recibieron HT adyuvante, mientras que en nuestra población lo recibieron todas las pacientes. Por lo tanto, parece evidente que las pacientes del estudio holandés recibieron un tratamiento subóptimo.

La tabla 33 muestra la asignación de grupo de riesgo en ambos trabajos.

Tabla 33. Diferencias de resultados de buen y mal pronóstico de MammaPrint® entre el estudio de validación⁸⁰ y nuestra serie

	Estudio de validación	Muestra serie
Buen pronóstico	61%	55%
Mal pronóstico	39%	45%

1.3.3 8-gene Score

El estudio de validación interno de 8-gene Score se realizó de manera retrospectiva sobre 153 pacientes diagnosticadas entre 1996 y 2002 de un carcinoma de mama ductal infiltrante en un único centro (HULP), estadio I o II anatomo-patológico según la clasificación TNM de 2002, receptores hormonales positivos y con un tratamiento que sigue el estándar actual en cuanto a cirugía, radioterapia adyuvante y tratamiento hormonal. El seguimiento clínico fue < 60 meses (excepto en casos de recidiva precoz).

Se analizó la asociación entre la expresión génica, las variables clínicas y la supervivencia libre de metástasis a distancia utilizando modelos de regresión de Cox. La supervivencia libre de metástasis a los cinco años fue del 97% para las pacientes de bajo riesgo, frente al 60% para las de alto riesgo. El 8-gene Score obtuvo un factor estadísticamente significativo en el análisis multivariante, y su desempeño fue similar al de dos perfiles de genes validados: la firma de 70 genes y el Recurrence Score®. La validez de la firma se verificó en cohortes independientes obtenidas de la base de datos GEO¹⁰³.

Respecto a nuestra serie, aunque la mediana de edad fue similar y todas las pacientes habían recibido HT adyuvante, en el trabajo de validación de 8-gene Score hubo más tumores con tamaño > 2 cm (50% frente 19%), con afectación ganglionar (38% frente a 21%) y con grado III (38% frente a 14%). Asimismo, la otra serie pudo incluir afectación ganglionar macroscópica, mientras que en la nuestra solo se admitieron micrometástasis.

Además, existen diferencias importantes en lo referente al tratamiento adyuvante administrado. Mientras que en el estudio 8-gene Score recibieron QT el 64% y dentro de este, un 27% con esquema de ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo (apropiado en esa época), en nuestro estudio lo hicieron un 31% de los casos, siendo todos ellos esquemas basados en antraciclinas y taxanos. Debido a estas limitaciones y al hecho de tratarse de una serie retrospectiva, los autores del trabajo indicaron que no se trataba de una validación formal, sino de un desarrollo inicial que precisaba de estudios de validación adecuados.

1.4 Falta de concordancia en nuestro trabajo y otros estudios de concordancia con MammaPrint® y Oncotype DX®

Cuando analizamos la concordancia entre los dos test genéticos comercializados y 8-gene Score, observamos que no hay acuerdo (índice kappa de -0.02).

En el caso de MammaPrint®, si comparamos los datos en términos absolutos, la coincidencia es de un 51% de los casos. El grupo de bajo riesgo del 8-gene Score coincidió en el 74% de los casos, pero el de alto riesgo en el 24%. En el caso de Oncotype DX®, la dificultad fue mayor, ya que se dicotomizó con un punto de corte de 25 basado en el ensayo TAILORx⁹¹ para poder valorar la concordancia con 8-gene Score. Tampoco hubo concordancia (índice kappa de 0,184): se observó coincidencia en el 85% de los casos de bajo riesgo 8-gene Score, pero solo en un 36% de los de alto riesgo.

Esto significa que el 8-gene Score identifica de forma adecuada a las pacientes de bajo riesgo, pero que clasifica también como de bajo riesgo a aquellas que los perfiles comercializados definen como de alto riesgo. Si asumimos la validez de los perfiles comerciales, este último grupo recibiría un infratratamiento, es decir, que no percibirían una QT adyuvante recomendable.

Hay pocos datos de comparación de la información pronóstica proporcionada por diferentes perfiles genómicos. Varios trabajos sugieren que la información facilitada es ampliamente equivalente para la población de mujeres con RH positivos^{133,134,152-156}. El estudio OPTIMA¹³²

comparó la estratificación de riesgo predeterminada y la clasificación de subtipo de diferentes pruebas génicas realizadas en la misma población. Se incluyeron 313 mujeres mayores de 40 años, bien con tumores < 3 cm y 1 a 9 con ganglios positivos, bien con tumores > 3 cm con ganglios negativos, en todos los casos RE+, HE2-. Las pacientes fueron asignadas al azar al tratamiento convencional (QT y terapia endocrina) o tratamiento dirigido por un perfil génico (QT si Oncotype DX® RS > 25). La estratificación del riesgo también se determinó con Prosigna® (PAM50), MammaPrint®, MammaTyper®, NexCourse Breast™ (IHC4-AQUA®) e IHC4 convencional (IHC4).

Los resultados fueron muy equiparables a nuestro estudio, ya que Oncotype DX® clasificó como de bajo riesgo al 82,1% de los tumores, frente al 86% en nuestra serie. El porcentaje de bajo riesgo con las diferentes plataformas fue: Prosigna® 65,5%; IHC4 72,0%; NexCourse Breast™ 61,6% y MammaPrint® 61,4% (algo más que en nuestra serie, que fue del 55%). De la misma manera que sucede en nuestra serie, hubo mayor acuerdo entre plataformas a la hora de identificar a la población de bajo riesgo.

Aunque el estudio es criticable por la población elegida, sirve para reflejar la falta de concordancia entre los distintos test relacionados con el pronóstico. De todo ello puede deducirse que los perfiles disponibles comercialmente no son comparables entre sí en cuanto a resultados. No cabe duda de que proporcionan información sobre el pronóstico, pero este depende de otros factores, de manera que suponen solo una ayuda para tomar una decisión terapéutica.

2. ASOCIACIÓN DE LOS PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS CLÁSICOS (T2, N1MIC, GRADO III, ILV, RP Y KI67% > 20%) Y LOS PERFILES GÉNICOS CON LA PROBABILIDAD DE CAMBIO DE TRATAMIENTO TRAS EL TEST GENÓMICO

Muchos estudios han analizado la correlación existente entre los factores clínico-patológicos clásicos y el resultado de los perfiles génicos. La mayoría de los estudios concluyen que el índice de proliferación Ki67 elevado y la baja expresión del RP se asocian con un resultado de alto riesgo de recaída^{51,108,138,140,157}.

Decidimos analizar la asociación entre los parámetros clínico-patológicos clásicos y la probabilidad de cambio en la recomendación de tratamiento tras la realización del test genómico. A partir de estos resultados se podrían identificar factores predictores del cambio en la estrategia terapéutica, con el fin de optimizar la selección de las pacientes candidatas a la realización de un test genómico reduciendo, de esta forma, los gastos asociados a la realización de este tipo de pruebas.

En este apartado, los resultados de nuestro trabajo son similares a los descritos en los estudios anteriores. Los factores clínico-patológicos que mejor predicen el cambio en la recomendación de tratamiento tras la realización del test genómico son: el grado tumoral, el índice de proliferación celular. En nuestra serie, la ausencia de expresión de RP, solo se asoció estadísticamente con el Oncotype DX® y se observaba una tendencia en la asociación, pero sin significación estadística, con los resultados de alto riesgo de Oncotype DX® y 8-gene Score cuando la expresión era < 20%.

Estos resultados deben interpretarse con cautela, ya que en la práctica clínica diaria la recomendación del tratamiento adyuvante del CM en estadio precoz se realiza en función de la valoración conjunta de todos los parámetros clínico-patológicos determinados al diagnóstico.

3. CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RE, RP Y HER2 MEDIANTE IHQ Y EXPRESIÓN GÉNICA DE ONCOTYPE DX® Y MAMMAPRINT®

Los estudios inmunohistoquímicos del CM revelan la expresión de determinadas proteínas en las células tumorales. El presente trabajo refleja la alta concordancia entre la IHQ clásica y la determinación de los mismos parámetros mediante expresión génica. Por lo tanto, la IHQ continúa siendo una alternativa válida y menos costosa que las plataformas génicas para este tipo de determinaciones.

Encontramos tres pacientes (2,4%) en la serie de MammaPrint® con resultado positivo de HER2 mediante expresión génica, pero en estos momentos desconocemos si el comportamiento es igual que los tumores HER2+ clásicos y mucho menos si un tratamiento dirigido frente a HER sería necesario y eficaz.

4. CAMBIO DE LA DECISIÓN TERAPÉUTICA ENTRE LOS FACTORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS CLÁSICOS Y ONCOTYPE DX® O MAMMAPRINT®

La incorporación de las plataformas genómicas como procedimiento diagnóstico en la práctica asistencial permite orientar de forma más precisa nuestra indicación terapéutica. Está bien demostrado su impacto sanitario, social y económico, con análisis de seguridad, eficacia y eficiencia. Gracias a ello, las plataformas aparecen en la mayoría de la cartera de servicios del sistema sanitario público y privado.

Tras conocer los resultados de los test genómicos de forma global, la decisión de tratamiento se modificó en 70 pacientes (32%). Aumentó la indicación de la HT sola en un 12% y disminuyó la de QT en un 14%, habiendo un cambio de QT a HT sola del 23% y, al contrario, del 9%. En consonancia con los datos publicados, hubo correlación entre la realización del test y la probabilidad de cambio en la decisión terapéutica.

Con los datos recogidos no se pueden explicar los casos en los que el tratamiento adyuvante prescrito fue contrario a lo dictado por el perfil génico. Siete pacientes con Oncotype DX® de bajo riesgo recibieron QT y otras 7 pacientes con un RS > 25, no. En el caso de MammaPrint®, 11 pacientes de bajo riesgo recibieron QT y otras 11 enfermas del grupo de alto riesgo, no. Esto supone un 16% de todas las pacientes, correspondiendo un 26% a infratratamientos y un 11% a sobretratamientos. El sobretratamiento ha sido aceptado comúnmente en nuestro medio hasta la llegada de las plataformas génicas, pero resulta más difícil justificar el infratratamiento^{18,59,79,80,158-161}. Como ya se ha indicado previamente, los perfiles ofrecen una ayuda para tomar decisiones, y parece que en estos casos el oncólogo antepuso los criterios anatomo-patológicos clásicos al resultado de la plataforma.

Otra posible causa de esta discordancia es la negativa de la propia paciente a realizar el cambio terapéutico, ya que la opinión de la enferma cada vez tiene mayor peso en la toma de decisiones en oncología. Para limitar esta situación, conviene explicar con claridad a la paciente el porqué de la prueba y tratar de identificar a las enfermas que ya tengan una decisión tomada sobre su tratamiento. De esa manera se evitaría el empleo de una prueba costosa.

5. CAMBIO DE LA DECISIÓN DE LA ACTITUD TERAPÉUTICA CON 8-GENE SCORE EN LOS HOSPITALES UNIVERSITARIOS RAMÓN Y CAJAL, LA PAZ Y BASURTO

A falta de una validación adecuada, desconocemos el verdadero valor pronóstico de 8-gene Score. Son necesarios los estudios futuros de validación para considerar este test comparable a Oncotype DX® y MammaPrint®. En el supuesto de que se hubieran dado por válidos los resultados de 8-gene Score en el presente trabajo, habría habido un cambio de decisión en 113 pacientes (51%). En 30 casos (25%) se habría pasado de hormona sola a QT-HT, mientras que en 83 pacientes (82%) se habría evitado la QT. Sin embargo, en la premisa de que el 8-gene Score no ofreciera información suficientemente fiable, habría habido riesgo de infratratarse a un 24% de las pacientes de alto riesgo, un porcentaje que actualmente es inadmisibles.

6. LIMITACIONES DE ESTE ESTUDIO

Existe una serie de limitaciones que deben tenerse en consideración:

- En primer lugar, remarcar que se trata de un estudio no aleatorizado. Es posible que se haya producido un sesgo en la selección de las pacientes: el clínico puede haber incluido en el estudio solo a aquellas enfermas en las que existieran dudas sobre la decisión de tratamiento adyuvante. En consecuencia, el impacto clínico de los test genómicos en la decisión final de tratamiento puede estar sobredimensionado.
- El método empleado por cada uno de los oncólogos en la estimación del riesgo de recaída en función de los parámetros clínico-patológicos clásicos no fue recogido en este estudio. Hubiese sido interesante conocer cómo analizan los oncólogos este riesgo antes de disponer del resultado del test genómico. Partiendo de la base de que es una estimación imprecisa, hay oncólogos que prefieren basar sus decisiones en las recomendaciones recogidas en una determinada guía clínica o apoyarse en los resultados numéricos —más objetivos— que ofrecen aplicaciones informáticas.
- A pesar de que una de las ventajas del test genómico Oncotype DX® es que ofrece una estimación continua del riesgo de recaída, en nuestro trabajo se prescindíó del grupo intermedio y se dicotomizaron los resultados cambiando los puntos de corte respecto a la descripción original del test.
- Tampoco queda claro si los test genómicos deben realizarse a todas las pacientes con RE positivos y ganglios negativos y cuál es el tratamiento óptimo en las enfermas con RS de riesgo intermedio definido por Oncotype DX®. Del mismo modo, aún está por definir el papel de estas plataformas en las pacientes con ganglios positivos.
- Nuestro trabajo no incluye un análisis de seguimiento largo de las pacientes. En este grupo, el manejo del CM tiene importantes consecuencias a largo plazo como son el riesgo de recaída o la aparición de segundos tumores en relación con el tratamiento de QT. Aunque solo han transcurrido cinco años desde que las primeras pacientes fueron incluidas en el estudio, no hay eventos suficientes para poder orientarnos en este aspecto. Hasta la fecha, en nuestra serie solo ha habido dos recaídas a distancia: ninguna en el HUB, donde se hicieron los Oncotype DX®, una paciente del HRyC y otra en el HULP.

CONCLUSIONES

1. Los resultados de 8-gene Score fueron escasamente concordantes con los de Oncotype DX® y MammaPrint®, por lo que no se puede recomendar su uso en la práctica clínica hasta que sea formalmente validado.
2. El 8-gene Score coincide con Oncotype DX® y MammaPrint® en la identificación de las pacientes de bajo riesgo, pero clasifica también como de bajo riesgo a un elevado porcentaje de las pacientes definidas como de alto riesgo por los otros dos perfiles.
3. Los test Oncotype DX® y MammaPrint® de nuestra serie modifican la decisión del tratamiento adyuvante en el 32% de los casos. La mayor parte de los cambios tienden hacia un tratamiento menos agresivo (23%) pasando de una recomendación inicial de QT y HT a un tratamiento únicamente hormonal.
4. La realización de los test genómicos en nuestra serie supuso una reducción en la recomendación de QT en el 14% de los casos, mientras que llevó al empleo de QT en un 16% de enfermas consideradas en principio de bajo riesgo.
5. Los test genómicos no aportan valor extra en la expresión génica de los receptores hormonales y HER2. La determinación estándar de estos factores pronósticos es totalmente fiable.

Tesis doctoral

RESUMEN

El CM infiltrante es el tumor maligno más frecuente en la mujer en los países occidentales y constituye un grupo heterogéneo de neoplasias. La QT adyuvante se administra en muchos casos tras la cirugía con el fin de reducir el riesgo de recaída. La decisión sobre qué pacientes deben recibir estos tratamientos se establece según criterios clínico-patológicos clásicos que son poco precisos, de manera que para complementar la información suministrada por estos criterios se han introducido herramientas predictivas basadas en perfiles de expresión génica. Tales instrumentos permiten un uso de la QT adyuvante restringido a las pacientes con mayor riesgo. En nuestro entorno, los perfiles génicos de mayor recorrido son Oncotype DX® y MammaPrint®.

En el presente estudio se examinó la concordancia entre estos perfiles clásicos y el 8-gene Score, un nuevo perfil génico desarrollado por el equipo investigación de Biología Molecular del HULP. El principal hallazgo del trabajo fue que existe poca correlación entre perfiles génicos, especialmente a la hora de identificar a las pacientes de alto riesgo, lo que supondría prescindir de la QT en este grupo de peor pronóstico. Por lo tanto, y en ausencia de estudios de validación adecuados, no se puede recomendar la utilización de 8-gene Score en la práctica clínica diaria. Los resultados se sitúan en la línea de otros trabajos que han comparado plataformas génicas y que también han encontrado escasa concordancia.

Por otro lado, se analizó la influencia que tenía el resultado de los perfiles génicos en cuanto a la administración de QT. El porcentaje de cambio fue del 32%, con una reducción del uso de la QT de un 14%. Finalmente, se comprobó que las técnicas de IHQ para determinar los receptores hormonales y HER2 tienen la misma fiabilidad que la determinación por expresión génica.

Tesis doctoral

AGRADECIMIENTOS

Han sido muchas las personas que de una u otra forma han contribuido a la realización de este trabajo y me han ayudado a seguir siempre hacia adelante, para todas ellas mi eterno agradecimiento.

Los que me conocen bien, saben que lo que digo y en este caso, lo que escribo, es lo que siento desde mi alma y lo digo con toda sinceridad sin la necesidad de traicionarme a mí misma en favor de los demás. Por ello, me gustaría hacer una especial mención a:

Al **Dr. Enrique Espinosa**, por su generosidad, iniciativa, implicación, constancia y estímulo, todo ello de una forma “humilde y sencilla”. Me has alentado con esas palabras “vamos bien”, “que no cunda el pánico”. Has sido desde hace muchos años, un maestro “médico” que has marcado mi profesión, y ha sido un verdadero placer, reencontrarme contigo para hacer este trabajo.

Al **Prof. Alfredo Carrato**, por haber depositado en mí tu confianza desde hace años, por facilitarme y darme tu apoyo incondicional en mi carrera profesional y para que esta tesis saliera adelante.

A la **Dra. Pilar Zamora**, a la que he descubierto tras años de haber finalizado la residencia y me has cautivado. Gracias por creer en mí, por animarme en tiempos difíciles, por darme grandes consejos, por transmitir esa energía contagiosa que me ha hecho crecer e ilusionarme en un momento de “bajón” profesional, y por ayudarme tanto, siempre con una sonrisa en los labios.

Al **Dr. Javier Cortés**, sin la liberación de la asistencia clínica que me has brindado estos meses, hubiera sido imposible terminar este trabajo. Cuando te conocí, me dijiste que la gente “te

aprecia o te odia”. Yo te aprecio desde el corazón, y no solo por este motivo. Gracias por mimarme tanto, soy consciente de ello. Intentaré estar a la altura.

A los Dres. **Juan Ángel Fresno** y **Ángelo Gámez**, por su ardor y apoyo en todo lo concerniente al campo de la biología molecular, base indispensable para que este trabajo haya llegado a buen puerto. Gracias por apostar por este proyecto científico y económico. ¡¡Me queda una deuda enorme con vosotros!!

Al Departamento de Estadística del Hospital Ramón y Cajal: **Dr. Javier Zamora**, nunca me dijiste “no” y tu apoyo y cariño lo noté siempre, quizás denotaba eso de ser “paisanos”. A **Borja Fernández**, que fue el que estuvo al pie de cañón conmigo: ¡¡vaya paciencia has tenido!! Sin ti, imposible comprender los resultados de esta tesis. Mi gratitud eterna.

A la **Dra. Purificación Martínez**, jefa del Servicio de Oncología Médica del Hospital de Basurto. Solo te vi una vez en un congreso, pero no sé cómo agradecerte tu generosidad, por compartir vuestros casos y hacer la base de datos, para poder llevar a cabo esta tesis. “El bien hacer abre cien puertas y el mal agradecer las cierra”. Ya sabes dónde estoy, para lo que quieras.

Al Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal, y en especial a la **Dra. Belén Pérez Mies**, por colaborar con su experiencia y profesionalidad en la revisión de parte de las muestras tumorales de este proyecto de forma tan rápida y eficaz.

A todos mis compañeros del **Servicio de Oncología Médica** del Hospital Ramón y Cajal: médicos adjuntos, residentes, secretarias, celadoras, auxiliares y enfermeras, por la ayuda y el cariño con que me han tratado todos estos años. Un “guiño” cariñoso para mis compañeras **María** y **Maru...**, ellas ya me entienden...

A mis **pacientes** que me dan lecciones vitales cada día, que me hacen recordar lo que de verdad importa y por lo que vale la pena todo mi esfuerzo diario, con mención especial a **Susana del Castillo** que estando en otro momento duro, no ha escatimado ni cariño ni ayuda en las gráficas ni un solo segundo.

A mi familia, por su amor y apoyo incondicional. A mis padres, gracias a los cuales he llegado hasta aquí, a los que debo todo. A mis suegros, también imprescindibles en mi vida. A mi hermano, que estando tan lejos, le noto al lado. A mis abuelos, que su alma esta con Dios, pero su amor y cariño, están en mi corazón.

Tesis doctoral

BIBLIOGRAFÍA

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2009;59(4):225-49.
2. Borrás JM, Colomer C, Soria P, Lopez R. Priorities for cancer control in Spain. *Ann Oncol.* 2010;21 Suppl 3:iii111-4.
3. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353(17):1784-92.
4. Jatoi I, Chen BE, Anderson WF, Rosenberg PS. Breast cancer mortality trends in the United States according to estrogen receptor status and age at diagnosis. *J Clin Oncol.* 2007;25(13):1683-90.
5. Smith BD, Jiang J, McLaughlin SS, Hurria A, Smith GL, Giordano SH, et al. Improvement in breast cancer outcomes over time: are older women missing out? *J Clin Oncol.* 2011;29(35):4647-53.
6. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2010;60(5):277-300.
7. Giordano SH, Buzdar AU, Hortobagyi GN. Breast cancer in men. *Ann Intern Med.* 2002;137(8):678-87.
8. Gabizon A, Shmeeda H, Grenader T. Pharmacological basis of pegylated liposomal doxorubicin: impact on cancer therapy. *Eur J Pharm Sci.* 2012;45(4):388-98.
9. Truong PT, Berthelet E, Lee J, Kader HA, Olivetto IA. The prognostic significance of the percentage of positive/dissected axillary lymph nodes in breast cancer recurrence and survival in patients with one to three positive axillary lymph nodes. *Cancer.* 2005. 103(10):2006-14.
10. Worsham MJ, Raju U, Lu M, Kapke A, Cheng J, Wolman SR. Multiplicity of benign breast lesions is a risk factor for progression to breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(18 Pt 1):5474-9.
11. Degnim AC, Visscher DW, Berman HK, Frost MH, Sellers TA, Vierkant RA, et al. Stratification of breast cancer risk in women with atypia: a Mayo cohort study. *J Clin Oncol.* 2007;25(19):2671-7.
12. Fisher B, Dignam J, Wolmark N, Wickerham DL, Fisher ER, Mamounas E, et al. Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-24 randomised controlled trial. *Lancet.* 1999;353(9169):1993-2000.
13. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet.* 1997;350(9084):1047-59.
14. Ronckers CM, Erdmann CA, Land CE. Radiation and breast cancer: a review of current evidence. *Breast Cancer Res.* 2005;7(1):21-32.
15. Henderson TO, Amsterdam A, Bhatia S, Hudson MM, Meadows AT, Neglia JP, et al. Systematic review: surveillance for breast cancer in women treated with chest radiation for childhood, adolescent, or young adult cancer. *Ann Intern Med.* 2010;152(7):444-55; W144-54.
16. Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer.* 2005;93(9):1046-52.
17. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-52.
18. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10869-74.
19. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(5):R68.
20. Zakhireh J, Gomez R, Esserman L. Converting evidence to practice: a guide for the clinical application of MRI for the screening and management of breast cancer. *Eur J Cancer.* 2008;44(18):2742-52.
21. AJCC Cancer Staging Manual. New York, NY: Springer Science+Business Media; 2016.
22. Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans V, et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005;366(9503):2087-106.
23. Rastelli F, Crispino S. Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer. *Tumori.* 2008;94(3):370-83.
24. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005;365(9472):1687-717.
25. Fisher B, Dignam J, Bryant J, Wolmark N. Five versus more than five years of tamoxifen for lymph node-negative breast cancer: updated findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-14 randomized trial. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(9):684-90.
26. Stewart HJ, Forrest AP, Everington D, McDonald CC, Dewar JA, Hawkins RA, et al. Randomised comparison of 5 years of adjuvant tamoxifen with continuous therapy for operable breast cancer. The Scottish Cancer Trials Breast Group. *Br J Cancer.* 1996;74(2):297-9.
27. Miller WR. Biological rationale for endocrine therapy in breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2004;18(1):1-32.
28. Davidson NE, O'Neill AM, Vukov AM, Osborne CK, Martino S, White DR, et al. Chemoendocrine therapy for premenopausal women with axillary lymph node-positive, steroid hormone receptor-positive breast cancer: results from INT 0101 (E5188). *J Clin Oncol.* 2005;23(25):5973-82.
29. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ, et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol.* 2009;20(8):1319-29.
30. Group BIGC, Mouridsen H, Giobbie-Hurder A, Goldhirsch A, Thurlimann B, Paridaens R, et al. Letrozole therapy alone or in sequence with tamoxifen in women with breast cancer. *N Engl J Med.* 2009;361(8):766-76.
31. Cuzick J, Sestak I, Baum M, Buzdar A, Howell A, Dowsett M, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(12):1135-41.
32. van de Velde CJ, Rea D, Seynaeve C, Putter H, Hasenburg A, Vannetzel JM, et al. Adjuvant tamoxifen and exemestane in early breast cancer (TEAM): a randomised phase 3 trial. *Lancet.* 2011;377(9762):321-31.
33. Jakesz R, Jonat W, Gnant M, Mittlboeck M, Greil R, Tausch C, et al. Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. *Lancet.* 2005;366(9484):455-62.
34. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353(16):1673-84.

35. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1659-72.
36. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2011;365(14):1273-83.
37. Fisher B, Brown AM, Dimitrov NV, Poisson R, Redmond C, Margolese RG, et al. Two months of doxorubicin-cyclophosphamide with and without interval reinduction therapy compared with 6 months of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in positive-node breast cancer patients with tamoxifen-nonresponsive tumors: results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-15. *J Clin Oncol*. 1990;8(9):1483-96.
38. Zambetti M, Bonadonna G, Valagussa P, Daidone MG, Coradini D, Bignami P, et al. Adjuvant CMF for node-negative and estrogen receptor-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 1992(11):77-83.
39. Piccart MJ, Di Leo A, Beauduin M, Vindevoghel A, Michel J, Focan C, et al. Phase III trial comparing two dose levels of epirubicin combined with cyclophosphamide with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in node-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2001;19(12):3103-10.
40. Smalley RV, Carpenter J, Bartolucci A, Vogel C, Krauss S. A comparison of cyclophosphamide, adriamycin, 5-fluorouracil (CAF) and cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil, vincristine, prednisone (CMFVP) in patients with metastatic breast cancer: a Southeastern Cancer Study Group project. *Cancer*. 1977;40(2):625-32.
41. Citron ML, Berry DA, Cirincione C, Hudis C, Winer EP, Gradishar WJ, et al. Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. *J Clin Oncol*. 2003;21(8):1431-9.
42. Sparano JA, Wang M, Martino S, Jones V, Perez EA, Saphner T, et al. Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer. *N Engl J Med*. 2008;358(16):1663-71.
43. Martin M, Pienkowski T, Mackey J, Pawlicki M, Guastalla JP, Weaver C, et al. Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;352(22):2302-13.
44. Muggia FM, Green MD. New anthracycline antitumor antibiotics. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1991;11(1):43-64.
45. Gabizon A, Shmeeda H, Grenader T. Pharmacological basis of pegylated liposomal doxorubicin: impact on cancer therapy. *Eur J Pharm Sci*. 2012;45(4):388-98.
46. Truong PT, Berthelet E, Lee J, Kader HA, Olivotto IA. The prognostic significance of the percentage of positive/dissected axillary lymph nodes in breast cancer recurrence and survival in patients with one to three positive axillary lymph nodes. *Cancer*. 2005;103(10):2006-14.
47. Mansour EG, Ravdin PM, Dressler L. Prognostic factors in early breast carcinoma. *Cancer*. 1994;74(1 Suppl):381-400.
48. Rauschecker HF, Sauerbrei W, Gatzemeier W, Sauer R, Schauer A, Schmoor C, et al. Eight-year results of a prospective non-randomised study on therapy of small breast cancer. The German Breast Cancer Study Group (GBSG). *Eur J Cancer*. 1998;34(3):315-23.
49. Fisher B, Slack NH, Bross ID. Cancer of the breast: size of neoplasm and prognosis. *Cancer*. 1969;24(5):1071-80.
50. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(28):7212-20.
51. De Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Jr., Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007;96(10):1504-13.
52. Sahin AA, Ro J, Ro JY, Blick MB, el-Naggar AK, Ordonez NG, et al. Ki-67 immunostaining in node-negative stage I/II breast carcinoma. Significant correlation with prognosis. *Cancer*. 1991;68(3):549-57.
53. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist*. 1998;3(4):237-52.
54. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235(4785):177-82.
55. Monteiro Ide P, Madureira P, de Vasconcelos A, Pozza DH, de Mello RA. Targeting HER family in HER2-positive metastatic breast cancer: potential biomarkers and novel targeted therapies. *Pharmacogenomics*. 2015;16(3):257-71.
56. Todd JH, Dowle C, Williams MR, Elston CW, Ellis IO, Hinton CP, et al. Confirmation of a prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 1987;56(4):489-92.
57. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1992;22(3):207-19.
58. D'Eredita G, Giardina C, Martellotta M, Natale T, Ferrarese F. Prognostic factors in breast cancer: the predictive value of the Nottingham Prognostic Index in patients with a long-term follow-up that were treated in a single institution. *Eur J Cancer*. 2001;37(5):591-6.
59. Eifel P, Axelson JA, Costa J, Crowley J, Curran WJ, Jr., Deshler A, et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(13):979-89.
60. Nielsen T, Wallden B, Schaper C, Ferree S, Liu S, Gao D, et al. Analytical validation of the PAM50-based Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay and nCounter Analysis System using formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens. *BMC Cancer*. 2014;14:177.
61. Olivotto IA, Bajdik CD, Ravdin PM, Speers CH, Coldman AJ, Norris BD, et al. Population-based validation of the prognostic model ADJUVANT! for early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(12):2716-25.
62. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5350-4.
63. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995;270(5235):467-70.
64. Butte A. The use and analysis of microarray data. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1(12):951-60.
65. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. 1975;98(3):503-17.
66. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*. 1996;6(10):995-1001.

67. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985;230(4732):1350-4.
68. Walker NJ. Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science*. 2002;296(5567):557-9.
69. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*. 2008;44(5):619-26.
70. Geffen DB, Abu-Ghanem S, Sion-Vardy N, Braunstein R, Tokar M, Ariad S, et al. The impact of the 21-gene recurrence score assay on decision making about adjuvant chemotherapy in early-stage estrogen-receptor-positive breast cancer in an oncology practice with a unified treatment policy. *Ann Oncol*. 2011;22(11):2381-6.
71. DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet*. 1996;14(4):457-60.
72. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999;286(5439):531-7.
73. Peppercorn J, Perou CM, Carey LA. Molecular subtypes in breast cancer evaluation and management: divide and conquer. *Cancer Invest*. 2008;26(1):1-10.
74. Yu K, Lee CH, Tan PH, Tan P. Conservation of breast cancer molecular subtypes and transcriptional patterns of tumor progression across distinct ethnic populations. *Clin Cancer Res*. 2004;10(16):5508-17.
75. Weigelt B, Hu Z, He X, Livasy C, Carey LA, Ewend MG, et al. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65(20):9155-8.
76. Perreard L, Fan C, Quackenbush JF, Mullins M, Gauthier NP, Nelson E, et al. Classification and risk stratification of invasive breast carcinomas using a real-time quantitative RT-PCR assay. *Breast Cancer Res*. 2006;8(2):R23.
77. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1160-7.
78. Haas JS, Liang SY, Hassett MJ, Shiboski S, Elkin EB, Phillips KA. Gene expression profile testing for breast cancer and the use of chemotherapy, serious adverse effects, and costs of care. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;130(2):619-26.
79. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-6.
80. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;347(25):1999-2009.
81. Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(17):1183-92.
82. Glas AM, Floore A, Delahaye LJ, Witteveen AT, Pover RC, Bakx N, et al. Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test. *BMC Genomics*. 2006;7:278.
83. Mook S, Schmidt MK, Viale G, Pruneri G, Eekhout I, Floore A, et al. The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;116(2):295-302.
84. Bueno-de-Mesquita JM, Linn SC, Keijzer R, Wesseling J, Nuyten DS, van Krimpen C, et al. Validation of 70-gene prognosis signature in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;117(3):483-95.
85. Wittner BS, Sgroi DC, Ryan PD, Bruinsma TJ, Glas AM, Male A, et al. Analysis of the MammaPrint breast cancer assay in a predominantly postmenopausal cohort. *Clin Cancer Res*. 2008;14(10):2988-93.
86. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J, Slaets L, Viale G, Delaloge S, et al. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(8):717-29.
87. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(27):2817-26.
88. Habel LA, Shak S, Jacobs MK, Capra A, Alexander C, Pho M, et al. A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res*. 2006;8(3):R25.
89. Stadler ZK, Come SE. Review of gene-expression profiling and its clinical use in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009;69(1):1-11.
90. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(23):3726-34.
91. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DE, et al. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(21):2005-14.
92. Filipits M, Rudas M, Jakesz R, Dubsky P, Fitzal F, Singer CF, et al. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clin Cancer Res*. 2011;17(18):6012-20.
93. Dubsky P, Brase JC, Jakesz R, Rudas M, Singer CF, Greil R, et al. The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2- breast cancer patients. *Br J Cancer*. 2013;109(12):2959-64.
94. Kronenwett R, Bohmann K, Prinzler J, Sinn BV, Haufe F, Roth C, et al. Decentral gene expression analysis: analytical validation of the Endopredict genomic multianalyte breast cancer prognosis test. *BMC Cancer*. 2012;12:456.
95. Dubsky P, Filipits M, Jakesz R, Rudas M, Singer CF, Greil R, et al. EndoPredict improves the prognostic classification derived from common clinical guidelines in ER-positive, HER2-negative early breast cancer. *Ann Oncol*. 2013;24(3):640-7.
96. Martin M, Brase JC, Calvo L, Krappmann K, Ruiz-Borrego M, Fisch K, et al. Clinical validation of the EndoPredict test in node-positive, chemotherapy-treated ER+/HER2- breast cancer patients: results from the GEICAM 9906 trial. *Breast Cancer Res*. 2014;16(2):R38.
97. Nielsen T, Wallden B, Schaper C, Ferree S, Liu S, Gao D, et al. Analytical validation of the PAM50-based Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay and nCounter Analysis System using formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens. *BMC Cancer*. 2014;14:177.
98. Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, Sidhu K, Dunbier AK, Cowens JW, et al. Comparison of PAM50 risk of recurrence score

with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. *J Clin Oncol*. 2013;31(22):2783-90.

99. Gnant M, Filipits M, Greil R, Stoeger H, Rudas M, Bago-Horvath Z, et al. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Ann Oncol*. 2014;25(2):339-45.

100. Gnant M, Sestak I, Filipits M, Dowsett M, Balic M, Lopez-Knowles E, et al. Identifying clinically relevant prognostic subgroups of postmenopausal women with node-positive hormone receptor-positive early-stage breast cancer treated with endocrine therapy: a combined analysis of ABCSG-8 and ATAC using the PAM50 risk of recurrence score and intrinsic subtype. *Ann Oncol*. 2015;26(8):1685-91.

101. Espinosa E, Vara JA, Redondo A, Sanchez JJ, Hardisson D, Zamora P, et al. Breast cancer prognosis determined by gene expression profiling: a quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction study. *J Clin Oncol*. 2005;23(29):7278-85.

102. Espinosa E, Sanchez-Navarro I, Gamez-Pozo A, Marin AP, Hardisson D, Madero R, et al. Comparison of prognostic gene profiles using qRT-PCR in paraffin samples: a retrospective study in patients with early breast cancer. *PLoS One*. 2009;4(6):e5911.

103. Sanchez-Navarro I, Gamez-Pozo A, Pinto A, Hardisson D, Madero R, Lopez R, et al. An 8-gene qRT-PCR-based gene expression score that has prognostic value in early breast cancer. *BMC Cancer*. 2010;10:336.

104. Hayes DF, Trock B, Harris AL. Assessing the clinical impact of prognostic factors: when is "statistically significant" clinically useful? *Breast Cancer Res Treat*. 1998;52(1-3):305-19.

105. Holt S, Bertelli G, Humphreys I, Valentine W, Durrani S, Pudney D, et al. A decision impact, decision conflict and economic assessment of routine Oncotype DX testing of 146 women with node-negative or pN1mi, ER-positive breast cancer in the U.K. *Br J Cancer*. 2013;108(11):2250-8.

106. Davidson JA, Cromwell I, Ellard SL, Lohrisch C, Gelmon KA, Shenkier T, et al. A prospective clinical utility and pharmacoeconomic study of the impact of the 21-gene Recurrence Score(R) assay in oestrogen receptor positive node negative breast cancer. *Eur J Cancer*. 2013;49(11):2469-75.

107. Geffen DB, Abu-Ghanem S, Sion-Vardy N, Braunstein R, Tokar M, Ariad S, et al. The impact of the 21-gene recurrence score assay on decision making about adjuvant chemotherapy in early-stage estrogen-receptor-positive breast cancer in an oncology practice with a unified treatment policy. *Ann Oncol*. 2011;22(11):2381-6.

108. Albanell J, Gonzalez A, Ruiz-Borrego M, Alba E, Garcia-Saenz JA, Corominas JM, et al. Prospective transGEICAM study of the impact of the 21-gene Recurrence Score assay and traditional clinicopathological factors on adjuvant clinical decision making in women with estrogen receptor-positive (ER+) node-negative breast cancer. *Ann Oncol*. 2012;23(3):625-31.

109. Eiermann W, Rezai M, Kummel S, Kuhn T, Warm M, Friedrichs K, et al. The 21-gene recurrence score assay impacts adjuvant therapy recommendations for ER-positive, node-negative and node-positive early breast cancer resulting in a risk-adapted change in chemotherapy use. *Ann Oncol*. 2013;24(3):618-24.

110. Nguyen MT, Stessin A, Nagar H, D'Alfonso TM, Chen Z, Cigler T, et al. Impact of oncotype DX recurrence score in the management of breast cancer cases. *Clin Breast Cancer*. 2014;14(3):182-90.

111. Hassett MJ, Silver SM, Hughes ME, Blayney DW, Edge SB, Herman JG, et al. Adoption of gene expression profile testing and association with use of chemotherapy among women with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(18):2218-26.

112. Schneider JG, Khalil DN. Why does Oncotype DX recurrence score reduce adjuvant chemotherapy use? *Breast Cancer Res Treat*. 2012;134(3):1125-32.

113. Ademuyiwa FO, Miller A, O'Connor T, Edge SB, Thorat MA, Sledge GW, et al. The effects of oncotype DX recurrence scores on chemotherapy utilization in a multi-institutional breast cancer cohort. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;126(3):797-802.

114. Joh JE, Esposito NN, Kiluk JV, Laronga C, Lee MC, Loftus L, et al. The effect of Oncotype DX recurrence score on treatment recommendations for patients with estrogen receptor-positive early stage breast cancer and correlation with estimation of recurrence risk by breast cancer specialists. *Oncologist*. 2011;16(11):1520-6.

115. Haas JS, Liang SY, Hassett MJ, Shiboski S, Elkin EB, Phillips KA. Gene expression profile testing for breast cancer and the use of chemotherapy, serious adverse effects, and costs of care. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;130(2):619-26.

116. Oratz R, Kim B, Chao C, Skrzypczak S, Ory C, Bugarini R, et al. Physician survey of the effect of the 21-gene recurrence score assay results on treatment recommendations for patients with lymph node-positive, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Oncol Pract*. 2011;7(2):94-9.

117. Kamal AH, Loprinzi CL, Reynolds C, Dueck AC, Geiger XJ, Ingle JN, et al. Breast medical oncologists' use of standard prognostic factors to predict a 21-gene recurrence score. *Oncologist*. 2011;16(10):1359-66.

118. Lo SS, Mumby PB, Norton J, Rychlik K, Smerage J, Kash J, et al. Prospective multicenter study of the impact of the 21-gene recurrence score assay on medical oncologist and patient adjuvant breast cancer treatment selection. *J Clin Oncol*. 2010;28(10):1671-6.

119. Henry LR, Stojadinovic A, Swain SM, Prindiville S, Cordes R, Soballe PW. The influence of a gene expression profile on breast cancer decisions. *J Surg Oncol*. 2009;99(6):319-23.

120. Asad J, Jacobson AF, Estabrook A, Smith SR, Boolbol SK, Feldman SM, et al. Does oncotype DX recurrence score affect the management of patients with early-stage breast cancer? *Am J Surg*. 2008;196(4):527-9.

121. Rayhanabad JA, Difronzo LA, Haigh PI, Romero L. Changing paradigms in breast cancer management: introducing molecular genetics into the treatment algorithm. *Am Surg*. 2008;74(10):887-90.

122. Oratz R, Paul D, Cohn AL, Sedlacek SM. Impact of a commercial reference laboratory test recurrence score on decision making in early-stage breast cancer. *J Oncol Pract*. 2007;3(4):182-6.

123. Bueno-de-Mesquita JM, van Harten WH, Retel VP, van't Veer LJ, van Dam FS, Karsenberg K, et al. Use of 70-gene signature to predict prognosis of patients with node-negative breast cancer: a prospective community-based feasibility study (RASTER). *Lancet Oncol*. 2007;8(12):1079-87.

124. Exner R, Bago-Horvath Z, Bartsch R, Mittlboeck M, Retel VP, Fitzal F, et al. The multigene signature MammaPrint impacts on multidisciplinary team decisions in ER+, HER2- early breast cancer. *Br J Cancer*. 2014;111(5):837-42.

125. Cusumano PG, Generali D, Ciruelos E, Manso L, Ghanem I, Lifrange E, et al. European inter-institutional impact study of MammaPrint. *Breast*. 2014;23(4):423-8.

126. Rouzier R, Pronzato P, Chereau E, Carlson J, Hunt B, Valentine WJ. Multigene assays and molecular markers in breast cancer: systematic review of health economic analyses. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139(3):621-37.
127. Hornberger J, Chien R, Krebs K, Hochheiser L. US insurance program's experience with a multigene assay for early-stage breast cancer. *Am J Manag Care.* 2011;17(5 Spec No):e194-202.
128. Levine MN, Julian JA, Bedard PL, Eisen A, Trudeau ME, Higgins B, et al. Population-based evaluation of the 21-gene assay in treatment decision making for early breast cancer in Ontario. *J Clin Oncol.* 2014;32 suppl 15: Abstr 583.
129. Chen E, Tong KB, Malin JL. Cost-effectiveness of 70-gene MammaPrint signature in node-negative breast cancer. *Am J Manag Care.* 2010;16(12):e333-42.
130. Retel VP, Joore MA, van Harten WH. Head-to-head comparison of the 70-gene signature versus the 21-gene assay: cost-effectiveness and the effect of compliance. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;131(2):627-36.
131. Gyorffy B, Hatzis C, Sanft T, Hofstadter E, Aktas B, Pusztai L. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast Cancer Res.* 2015;17:11.
132. Bartlett JM, Bayani J, Marshall A, Dunn JA, Campbell A, Cunningham C, et al. Comparing Breast Cancer Multiparameter Tests in the OPTIMA Prelim Trial: No Test Is More Equal Than the Others. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(9).
133. KB Clough BP, F Jamshidian, S Butler, C Svedman and E Levy. Abstract P6-07-03: Risk classification of Early Stage Breast Cancer as Assessed by MammaPrint and Oncotype DX Genomic Assays. *Cancer Res November 14 2014 72 (24 Supplement) P6-07-03; DOI:10.1158/0008-5472.SABCS12-P6-07-03.*
134. SC Shivers LC, N Esposito, N Howard, J King, G Acs, D Ellis, V Vrcelj, A Zanchi, L Stork-Sloots, F de Snoo, FL Baehner, SM Butler, F Jamshadian, AP Sing, PW Blumencranz and CE Cox. Abstract P6-06-02: Direct comparison of risk classification between MammaPrint®, Oncotype DX® and MammoStrat® assays in patients with early stage breast cancer. *Cancer Res March 26 2014 73 (24 Suppl) P6-06-02; DOI:10.1158/0008-5472.SABCS13-P6-06-02.*
135. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
136. Cronin M, Pho M, Dutta D, Stephens JC, Shak S, Kiefer MC, et al. Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol.* 2004;164(1):35-42.
137. Sapino A, Roepman P, Linn SC, Snel MH, Delahaye LJ, van den Akker J, et al. MammaPrint molecular diagnostics on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn.* 2014;16(2):190-7.
138. Ellis MJ, Suman VJ, Hoog J, Goncalves R, Sanati S, Creighton CJ, et al. Ki67 Proliferation Index as a Tool for Chemotherapy Decisions During and After Neoadjuvant Aromatase Inhibitor Treatment of Breast Cancer: Results From the American College of Surgeons Oncology Group Z1031 Trial (Alliance). *J Clin Oncol.* 2017;35(10):1061-9.
139. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, et al. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol.* 2015;26(8):1533-46.
140. Prat A, Cheang MC, Martin M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31(2):203-9.
141. Hayes DF, Trock B, Harris AL. Assessing the clinical impact of prognostic factors: when is "statistically significant" clinically useful? *Breast Cancer Res Treat.* 1998;52(1-3):305-19.
142. Albain KS, Barlow WE, Shak S, Hortobagyi GN, Livingston RB, Yeh IT, et al. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(1):55-65.
143. Dowsett M, Cuzick J, Wale C, Forbes J, Mallon EA, Salter J, et al. Prediction of risk of distant recurrence using the 21-gene recurrence score in node-negative and node-positive postmenopausal patients with breast cancer treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study. *J Clin Oncol.* 2010;28(11):1829-34.
144. Mook S, Schmidt MK, Weigelt B, Kreike B, Eekhout I, van de Vijver MJ, et al. The 70-gene prognosis signature predicts early metastasis in breast cancer patients between 55 and 70 years of age. *Ann Oncol.* 2010;21(4):717-22.
145. Hartmann S, Gerber B, Elling D, Heintze K, Reimer T. The 70-Gene Signature as Prognostic Factor for Elderly Women with Hormone Receptor-Positive, HER2-Negative Breast Cancer. *Breast Care (Basel).* 2012;7(1):19-24.
146. Del Barco S, Ciruelos E, Tusquets I, Ruiz M, Barnadas A; SEOM. SEOM clinical guidelines for the systemic treatment of early breast cancer 2013. *Clin Transl Oncol.* 2013;15(12):1011-7.
147. Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Andre F, Collyar DE, Gonzalez-Angulo AM, et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol.* 2016;34(10):1134-50.
148. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015;26 Suppl 5:v8-30.
149. Kim C, Paik S. Gene-expression-based prognostic assays for breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010;7(6):340-7.
150. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med.* 2009;360(8):790-800.
151. Hanrahan EO, Valero V, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN. Prognosis and management of patients with node-negative invasive breast carcinoma that is 1 cm or smaller in size (stage 1; T1a,b,N0M0): a review of the literature. *J Clin Oncol.* 2006;24(13):2113-22.
152. Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DS, Nobel AB, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(6):560-9.
153. Kelly CM, Bernard PS, Krishnamurthy S, Wang B, Ebbert MT, Bastien RR, et al. Agreement in risk prediction between the 21-gene recurrence score assay (Oncotype DX(R)) and the PAM50 breast cancer intrinsic Classifier in early-stage estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncologist.* 2012;17(4):492-8.
154. Mackay A, Weigelt B, Grigoriadis A, Kreike B, Natrajan R, A'Hern R, et al. Microarray-based class discovery for molecular classification of breast cancer: analysis of interobserver agreement. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(8):662-73.

155. Weigelt B, Mackay A, A'Hern R, Natrajan R, Tan DS, Dowsett M, et al. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2010;11(4):339-49.
156. Zhao X, Rodland EA, Sorlie T, Vollaer HK, Russnes HG, Kristensen VN, et al. Systematic assessment of prognostic gene signatures for breast cancer shows distinct influence of time and ER status. *BMC Cancer.* 2014;14:211.
157. Sahebjam S, Aloyz R, Pilavdzic D, Brisson ML, Ferrario C, Bouganim N, et al. Ki 67 is a major, but not the sole determinant of Oncotype Dx recurrence score. *Br J Cancer.* 2011;105(9):1342-5.
158. Love RR. Meeting highlights: International consensus panel on the treatment of primary breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002;20(7):1955-6; author reply 6-7.
159. Kaufmann M, Morrow M, von Minckwitz G, Harris JR; Biedenkopf Expert Panel Members. Locoregional treatment of primary breast cancer: consensus recommendations from an International Expert Panel. *Cancer.* 2010;116(5):1184-91.
160. Consensus conference 2000: adjuvant therapy for breast cancer. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement November 1-3, 2000. *Cancer Control.* 2001;8(1):55.
161. Tuma RS. A big trial for a new technology: TransBIG Project takes microarrays into clinical trials. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(9):648-9.

